الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
جامعة منتوري قسنطينة

كلية العلوم الدقيقة   قسم الكيمياء

رقم الترتيب ....

رقم التسلسل ....

مذكرة
مقدمة لنيل شهادة الماجستير في العلوم
تخصص تحاليل فيزيوكيميائية
و كيمياء عضوية

تحت عنوان

فصل و تحديد منتجات الأيض الفلافونيدي لنبات *Mentha arvensis*

تقديم:
تيوب عمر

تحت إشراف الأستاذ:
د. احسن بورغدة

لجنة المناقشة:

- د. فضيلة بن عياش   أستاذة بجامعة منتوري قسنطينة   رئيسة

- د. احسن بورغدة   أستاذ محاضر بجامعة منتوري قسنطينة   مقررا- د.

سمير بن عياش   أستاذ بجامعة منتوري قسنطينة   ممتحنا

- د. محمد بوهروم   أستاذ محاضربجامعة منتوري قسنطينة   ممتحنا

- د. بهلول الشريف   أستاذ محاضربجامعة منتوري قسنطينة   ممتحنا

2010................

باسم الله الرحمن الرحيم
والصلاة والسلام على أشرف المرسلين

الإهداء

أهدي ثمرة جهدي هذا إلى أغلى الأحباب إلى :

أمي وأبي و جدتي حفظهم الله

وإلى إخوتي الأعزاء وإلى كل أفراد العائلتين:

تبوب و كمال:

و إلى كل الأهل والأحباب.

تشكرات

الحمد لله الذي بيده الملك و الملكوت، و له الأسماء الحسنى و النعوت، العالم فلا يعزب عنه شيء في السماوات و الأرض و لا يفوت ، علم بالقلم، علم الإنسان ما لم يعلم، و الصلاة و السلام على معلم البشر و آله، ما اتصل بالإسلام جده المبخوت وانقطع بالكفر حبله المبتوت و سلم كثيرا. .

أتوجه بالشكر الخاص إلى الأستاذة الفاضلة فضيلة بن عياش على كل النصائح و المساعدات، و التي لم تقصر في حقنا و لم تبخل علينا بشيء و لو على حساب صحتها حفظها الله.

كما أشكرها على قبولها رئاسة لجنة المناقشة

أتقدم بالشكر الجزيل وكل العرفان للأستاذ بن عياش سمير لاستقباله لنا في مخبره " تثمين الثروات الطبيعية ذات الأصل النباتي و اصطناع الجزيئات الفعالة بيولوجيا VAREN و توفيره لمختلف الوسائل و التجهيزات لإنجاز هذا العمل و كذا على اهتمامه بإنجاز هذا البحث إضافة إلى قبوله المشاركة في لجنة المناقشة

أتقدم بجزيل الشكر والامتنان للأستاذ المشرف بورغدة احسن الذي كان لي المشرف و الموجه و المعين خلال مراحل إنجاز هذا العمل.

كما أشكر كل من الأساتذة : بوهروم محمد و بهلول الشريف على قبولهما المشاركة في لجنة المناقشة.

كما أشكر كل أفراد مخبر VAREN فالبداية الشكر الخالص للأساتذة :مشحود ،.زهية ، وهيبة و أحمد و كل أفراد دفعتي عبد الرحمان، سهام، رضوان، حنان، محمد، سميرة، لبيب، مجدة، فريد، فيروز، سيف، لويزة.

كما اشكر كل من سهام ونوال

و الشكر إلى كل من ساعدنا من قريب أو بعيد في إنجاز هذا البحث من البداية إلى غاية الانتهاء. و أجدد شكري إلى الله ربي و الحمد لله ربي العالمين.

الفهرس

الفصل الثاني

الفصل الثالث

الفصل الرابع

المقدمة

من المشاهد في واقعنا اليومي زيادة اهتمام الناس بالطب والعلاج الطبيعي، والتداوي بالأغذية الطبيعية و الأعشاب و النباتات الطبية و الوصفات الشعبية المجربة من أهل الخبرة .

قديما كانت تستعمل الأعشاب كمصدر رئيسي في معظم العقاقير، [2,1] فمملكة النبات تزود الطب بصفة مستمرة فتستعمل في شكلها الخام على شكل شايات، شراب، منقوع، مراهم، دهان أو مساحيق حيث اعتمد الإنسان في الحضارات القديمة خاصة بلاد الرافدين و بابل و أشور و حضارة مصر القديمة على الأعشاب الطبية في معالجة الأمراض بجانب طرق أخرى منها الرقي و التعاويذ و السحر ،لقد كان للعرب السبق في الترجمة و الدراسة و التجربة لكل ما جاء في كتب الأقدمين عن المعالجة بالأعشاب وقد برع منهم الكثيرون في هدا الفن حتى ان مؤلفاتهم ظلت لقرون عديدة مرجعا للطب و العلاج في أوروبا ودلك لما تضمنته من معلومات مهمة عن العلاج بالإعشاب والوقاية من الأمراض المختلفة [3]

مع تطور الكيمياء و الطب الغربي أعتمد على التداوي بالعقاقير والأدوية المصنعة [4] إلا أن صناعة بعض هذه الأدوية غير عملية اقتصاديا، ناهيك عن السلبيات الناجمة عنها من مضاعفات وأمراض سرطانية و أعراض جانبية، عانى منها الكثير من المرضى، و مع بداية السبعينات بدأت العودة بالتدريج إلى الاهتمام بالأعشاب الطبية لمّا أثبتت الدراسات أنّ لتلك الأدوية آثارا جانبية خطيرة في معظم الأحيان ، بينما تكون تراكيز هذه المواد الفعّالة متوازنة و مخففة في النبات و تتفاعل برفق مع الجسم البشري في صورتها الطبيعية ، إضافة إلى تعاون بعض المواد الموجودة في النبات معها حتى و لو كانت على شكل آثار فقط. مما أدى بكثير من سكان العالم اليوم بالعودة إلى استعمال النباتات الطبية في مختلف علاجاتهم ، الأمر الذي جعل الهيئات المختصة تبذل جهودا لمسايرة الوضع الجديد حيث أخذت بعض المنظمات خطوات مهمة لتشجيع العلماء على البحث في هذا المجال و تطويره كمنظمة الصحة العالمية و الإتحاد الأوروبي [6،5] مما نتج عنه أنّ:

- 40 ٪ من الأدوية المستعملة عبارة عن عناصر طبيعية.
- 50 ٪ من الوصفات الطبية في الولايات المتحدة الأمريكية- حسب إحصائيات 1995- تحتوي على الأقل على دواء مستخرج من أصل طبيعي.
- من مجموع الأدوية الجديدة التي طرحت في السوق ما بين:1981 – 2002 م ،14 ٪ لمعالجة الأمراض السرطانية ، 7 ٪ ضدّ الحساسية و 15 ٪ ضد بعض الطفيليات هي عبارة عن مركبات طبيعية [7 ،8].

و نظرا لتربع الجزائر على مساحات شاسعة فقد أكسبها ذلك وجود تضاريس و ظروف مناخية متعددة و قد انعكس ذلك على النمط النباتي، مما جعلها من البيئات النباتية النادرة حيث تنوع الغطاء النباتي و تدرجه من الغابات الرطبة الكثيفة إلى النباتات الجافة الصحراوية المبعثرة والمحدودة الانتشار، و انعكس ذلك بدوره على وجود العديد من الفصائل، الأجناس و الأنواع النباتية (تنوع الفلورا نفسها) و على وجود العديد من الأنماط البيئية Ecotypes و الأنماط الحيوية Biotypes، وترتب عن هذا كله نمو مئات من الأنواع النباتية البرية المختلفة و التي بدورها تضم العديد من النباتات الطبية، و رغم هذا التنوع في مناخ الجزائر ما يعني الوفرة في الغطاء النباتي خاصة بالنسبة للنباتات الطبية، حيث يصل عدد النباتات إلى 3000 نبتة تنتمي إلى مختلف العائلات النباتية، 15% منها محلية [9]، لكن تبقى الأبحاث بخصوصها قليلة سواء على مستوى الفيتوكيمياء أو في مجال الفارماكولوجيا.

و في الوقت الحالي بدأ الباحثون الجزائريون و حتى الأجانب في استغلال الثروة النباتية في الجزائر في مجال الكيمياء والطب. لذا كان الهدف من بحثنا استخلاص الأيض الثانوي الفلافونيدي لإحدى النباتات الشمالية *Mentha arvensis*.

يضم هذا العمل اربعة فصول:

الفصل الأول: تطرقنا فيه إلى التعريف بالفلافونيدات ، الاصطناع الحيوي لها و أخيرا فعاليتها بيولوجيا.

الفصل الثاني: خصصناه لكيفية الاستخلاص و تحديد بنى الفلافونيدات بواسطة الطرق الفيزيوكيميائية و الكروماتوغرافية المعروفة.

الفصل الثالث: عرضنا فيه معلومات نباتية و كيميائية عن العائلة و النبتة المدروسة وكذا الطريقة العملية التي أنجز بها هذا العمل المتمثل في استخلاص، فصل و تنقية الفلافونيدات إضافة إلى النتائج الكيميائية

الفصل الرابع :قمنا بتحديد الصيغ البنيوية للمركبات المفصولة.

.

الفصل الأول

المركبـــــــات الفلافونـــويديـــة

I الفلافونويدات :

I – 1مفاهيم أساسية :

I – 1-1 التعريف بالفلافونيدات :

الفلافونويدات عبارة عن مركبات طبيعية من نواتج الأيض الثانوي، و هي صبغات نباتية تتواجد في مختلف أجزاء النبتة (جذور، أوراق، أزهار)، غير أنها تتواجد بتراكيز عالية في القسم الهوائي. توجد في معظم الأصناف النباتية خاصة الراقية منها، و هي واسعة الانتشار عند كاسيات البذور، متوسطة الحضور عند عاريات البذور و شبه منعدمة عند الطحالب[10] كما وجدت عند الحزازيات[11]، كذلك عند نباتات أحادية الفلقة، و تعتبر كأداة تشخيصية لذوات الفلقتين[10].

تتواجد بصفة عامة في الخلايا السطحية للأنسجة النباتية، حيث تؤمن لها الحماية من الأشعة فوق البنفسجية المضرة[12]. كما أنها تتواجد منحلة في الفجوات على شكل إيتيروزيدات hétéroside (أي الفلافونويدات التي تنحل في الماء) أما بقية الفلافونويدات التي تنحل في مذيبات غير قطبية (أي الفلافونويدات عديدة الميتوكسيل) فنجدها في سيتوبلازما الخلية [13]، بالنسبة للأجليكونات فتتوضع على سطح النبات بخاصة الأوراق، حيث تكون ملازمة لمواد هي الأخرى ليبوفيلية و تلاحظ هذه الظاهرة خصوصا عند نباتات المناطق الجافة و شبه الجافة[14].

جميع الفلافونويدات تحتوي على 15 ذرة كربون و ذلك في هيكلها الأساسي موزعة على الشكل C_6-C_3-C_6 بحيث تتصل الحلقتان البنزينيتان "A" و "B" بسلسلة من 3 كربونات و التي تشكل عموما حلقة غير متجانسة"C" بعد الالتحام معال OH الفينولي للحلقة A[15]

.

A OH B A O C B

الشكل -1- يبين مختلف الهياكل الفلافونويدية

I –1–2اقسام الفلافونيدات :

نستطيع أن نقسم الفلافونويدات انطلاقا من الاصطناع الحيوي لها, فبعضها يعتبر وسائط ومركبات نهائية في الاصطناع الحيوي مثل الشالكونات, الفلافانو–3–أول , فلافان–3,4–ديول . بعضها الآخر تعرف فقط بالمركبات النهائية في الاصطناع الحيوي كأنثوسيانينات, الفلافانونات, الفلافونولات معظم الفلافونويدات ملخصة في الهياكل في الجدول المبينة التالي [16]

أهم المركبات		مختلف أقسام الفلافونيدات		
التسمية	مواقع OH	إسم العائلة	البنية	المشتقات
apegenidine luteolidine	5,7,4’ 5,7,3’,4’	R= H Flavylium (Anthocyane)		2-phényl- benzopyriliums
cyanidine	5,7,3’,4’	R=OH Anthocyanidine		
apeginine luteoline	5,7,4’ 5,7,3’,4’	R= H Flavone		2-phényl- chromones
kaempférol quercetine	5,7,4’ 5,7,3’,4’	R= OH Flavonol		
narengenine butine	5,7,4’ 7,3’,4’	R= H Flavanone (dihydroflavone)		
fustine taxifoline	7,3’,4’ 5,7,3’,4’	R=OH Flavanonol		
daidzein orobo	7,4’ 5,7,3’,4’	Isoflavone		Phenyl- 3chromone

الجدول(1): أنواع الفلافونيدات

مختلف أقسام الفلافونيدات			أهم المركبات	
المشتقات	البنية	إسم العائلة	مواقع OH	التسمية
2-phényl-chromanes		R= H Catechine (flavanol-3)	5,7,3’4’, 5’ 5,7,3’,4’	galocatechine catechine
		R=OH Leucoanthocyanid (flavandiol- ine 3,4)	5,7,3’,4’	leucocyanidine
2-phényl-chromanes		R= H Catechine (flavanol-3)	5,7,3’4’, 5’ 5,7,3’,4’	galocatechine catechine
		R=OH Leucoanthocyanid (flavandiol- ine 3,4)	5,7,3’,4’	leucocyanidine
2-benzylidène-coumaranones (aurone)		Aurone	6,3’,4’ 6,7,3’,4’	sulphuretine maritimetin

الجدول(2): أنواع الفلافونيدات)تابع (

I-2 الاصطناع الحيوي :

نظرا لأهمية الفلافونويدات وإنتشارها الواسع , فقد أثارت إهتمام الباحثين الكيميائيين والبيولوجيين وحتى علماء الوراثة وقاموا بتوجيه أبحاثهم لمعرفة أصل التطور الوراثي لهذه المركبات , أي كيف يتم تصنيعها داخل النبات . فالاصطناع الحيوي للفلافونويدات يتبع عدة مسالك لتكوين النظام الحلقي داخل النباتات الراقية, حيث انه تم إجراء تجارب عديدة و ذلك باستعمال النظائر الموسومة بـ ^{14}C المشع، فقد لاحظ الباحث " Robinson " سنة 1936[17] أن النواتين البنزينيتين للمركبات الفلافونيدية ليس لهما نفس الأصل الوراثي الحيوي و عليه فإن عملية الاصطناع الحيوي تتم خلال ثلاثة مراحل:

ا-2- 1 طريق الشيكيميك :

و هي المرحلة الأولى حيث أن الباحث " Davis " أثبت سنة 1955 [18] دور حمض الشيكيميك في تكوين الحلقة B و كذلك السلسلة الكربونية الثلاثية C_3 و ذلك بدءا بالغلوكوز، كما هو مبين في الشكل-2-

بينما الجدول التالي يبين الأنزيمات الداخلة في تكوين حمض Ac.p-Coumarique

الرقم	الإنزيم
1	Aldolase, 3-désoxy-O-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase ou DHAP synthase
2	Déshydroquinate synthase
3	Déshydroquinate déshydratase
4	Shikimate déshydrogénase
5	Complexe shikimate kinase
6	Ac.Phosphate pyruvique
7	Chorismate mutase
8	Préphénate déshydrogénase
9	Aminitrensférases
10	Tyrosine ammonia-lyase

<u>الجدول-3- الأنزيمات الداخلة في تكوين حمض Ac.p-Coumarique</u>

4-Phosphate erythrose + Ac.Phosphate pyruvique

1 (H_2O → Pi)

Ac.2-Ceto-3-desoxy-7-phosphoglucoheptonique

2 (Pi)

Ac.5-Dehydroquinique

3 (H_2O)

Ac.5-Déhydroshikimique

4

Ac.Shikimique

5 (ATP → ADP+Pi)

Ac.5-Phophoshikimique

6

Ac.3-Enolpyruvyl-5-phosphoshikimique

(Pi)

Ac.Chorismique

7

Ac.Prephénique

8 (CO_2, H+)

Ac.p-Hydroxyphenyl pyruvique

9

Ac.p-Hydoxyphenyl alanine

10

Ac.p-Hydroxycinnamique (Ac.p-coumarique)

الشكل 2:تكوين حمض Ac.p-coumarique انطلاقا من الجلوكوز مرورا بحمض الشيكيميك

ثم يتحول Ac.p-coumarique الى p-coumaroyl-CoA

الشكل3 : تحول Ac.p-coumarique الى p-coumaroyl-CoA

-

I-2-2 طريق الخلات :

الحلقة A تتشكل من تكاثف رأس – ذيل لثلاث وحدات من الخلات على شكل Malonyl-CoA مع حمض Ac.P-Coumarique. كما هو موضح في الشكل -4- [19-20-21-22].

الشكل – 4- تكوين الشالكون

I-2-3 الاصطناع الحيوي لمختلف الهياكل الفلافونويدية بدءا من الشالكون :

يعتبر الشالكون النواة الرئيسية التي تنحدر منها مختلف هياكل الفلافونيدات [23] و الذي يتكون من تكاثف ثلاث وحدات من Malonyl-CoA مع p-coumaroyl-CoA كما هو موضح في (الشكل -5-).

naringine

genisine

Dihydro kaempférol

apigénine

Apiforl

Apipenidine-5-O-glucoside

leucopelargonidine

kaempferol

Afzélechol

pelaronidine

pelargoinid 3-glucoside

propelagonidin B-3

الشكل -5- الإصطناع الحيوي لمختلف الهياكل الفلافونويدية انطلاقا من الشالكون

_تم تلخيص قائمة الإنزيمات الداخلة في التصنيع الحيوى في الجدول التالي:

الرقم	الإنزيم(ACRONYME)	العامل المساعد(CO-FACTEUR)
I	Acétyl-CoA	Non
II	Phénylalanine ammonia-lyase(PAL)	Non
III	Cinnimate 4- hydroxylase (C_4H)	NADPH
VI	4-Coumarate:CoA ligase (4CL)	CO-Sh ATP
1	Chalcone synthase (CHS)	Non
2	Polyketide réductase (PKR)	NADPH
3	Chalcone isomérase	Non
4	2-Hydroxyisoflavone synthase (IFS)	NADPH
5	2-Hydroxyisoflavanol déshydrathase	Non
6	6-a Flavone synthase I (FNSI)	NADPH
6	6-b Flavone synthase II (FNSI)	NADPH
7	Flavanone 3-hydroxylase (FHT)	2-Oxoglutarate Fe^{2+} ascoparate
8	Flavonol synthase (FLS)	2-Oxoglutarate Fe^{2+} ascoparate
9	Dihydroflavanol 4- réductase (DFR)	NADPH
10	Flavanone 4-réductase (FNR)	NADPH
11	Leucoanthocyanidine 4-réductase	NADPH
12	Anthocyanine synthase (ANS)	Inconnu
13	Flavonoid 3-O-glucosyltransférase (FGT)	
14	Flava-3,4-cis-diol-reductase	Non
15	Anthocyanidine / flavonol 3-O-glucosyltransférase	non

الجدول-4- الإنزيمات الداخلة في التصنيع الحيوى

I-2-4 تثبيت المجموعات الاستبدالية على الهيكل الفلافونويدي:

I -2-4 - 1 تثبيت مجموعات الهيدروكسيل:

يعود تثبيت مجموعات هيدروكسيل الحلقة A إلى نمط تكوين الهيكل الفلافونيدي، فتكون ثنائية الاستبدال في الموضعين 5 و 7 بنسبة 90 % إذ تعد كمجموعات هيدروكسيلية أصلية. ويعود وجود ثلاث هيدروكسيلات أو هيدروكسيل واحد على الحلقة A في بعض الفلافونيدات إلى كون هذه الأخيرة تتبع اصطناعا حيويا مغايرا للأول. أما بالنسبة لهيدروكسيلات الحلقة B، فيعتبر هيدروكسيل الموضع '4 هو الوحيد الذي يتم تثبيته قبل تكوين الفلافونيد، في حين تكون المواقع '2، '6 نادرة الاستبدال [24].

على سبيل المثال **2** l'apigénine

الشكل -6- Apigénine 2

I – 2-4-2- تثبيت مجموعات الميثيل :

إن تثبيت المثيل يأتي بعد تثبيت الهيدروكسيل، و يتم هذا الأخير على هيكل الأجليكون في حالتين :

الحالة الأولى:

تكون الرابطة بين كربون المثيل و كربون النواتين A و(أو)B و مثال على ذلك المركب

8-C-méthylgalangine

الشكل-7-

الحالة الثانية:

هي مثيلية المجموعات الهيدروكسيلية التي تم تثبيتها من قبل (*O*-methylation) و هذا في وجود أنزيم *O*-methyltransférase كمانح للمثيل [25] والشكل التالي يبين ذلك.

Lutéoline

SAM

SAH

Chrysoériol

SAM : S – adénosyl méthionine
SAH : S – adénosyl homocysteine

الشكل -*8*- التحول الإنزيمي لـ lutéoline إلى chrysoériol

كما يمكن ظهور مجموعات ميثوكسي عن طريق المثيلية المباشرة على الحلقة البنزينية[26].

I – 2-4- 3- تثبيت جزيئات السكر:

توجد المركبات الفلافونيدية على هيئة جليكوزيدات، أي أن بناءها يحتوي على وحدات سكرية قد تكون أحادية أو ثنائية كما يمكن أن يدخل في بناء المركب أكثر من مستبدل سكري.

و ترتبط وحدة السكر بذرة أكسجين مجموعة الهيدروكسيل مباشرة أي من نوع (*O*-heterosidique) و عادة يكون هيدروكسيل الموضع 7 للفلافونات و هيدروكسيل الموضع 3 للفلافونولات و يتم تثبيت السكر في وجود إنزيم"*O* -glucosyl transférase" و مانح للسكر مثل :

"UDP-glu" (Uridine diphosphate glucose) [27] والشكل التالي يوضح ذلك.

3-O-glucosyl transferase

UDP- glu UDP

quercétine 3-O-glucosylquercétine

الشكل-9-

كما قد ترتبط وحدة السكر بإحدى ذرات كربون الحلقة العطرية للهيكل الفلافونيدي أي من نوع (*C-hétérosidique*) و تتشكل الرابطة في هذه الحالة بين ذرة الكربون الأنوميري C_1 لجزيء السكر و أحد الموضعين C_6 أو C_8 للأجليكون، و تنشأ رابطة من نوع كربون – كربون , و تتم بعد تكوين الشالكون مباشرة [28] ، و مثال على ذلك المركب *vitexine*

vitexine

الشكل-10-

و الشكل التالي يوضح المواقع الأكثر تكرارا لارتباط مجموعات الهيدروكسيل بالهيكل الفلافونيدي, وكذلك مجموعات السكر من نوع *O*- glycosylation (سهم ممتلئ) و/أو *C*- glycosylation (سهم المتقطع) [29].

الشكل-11-

I-3 الاصطناع المخبري :

من أجل تصنيع الفلافونويدات مخبريا، فنظريا توجد أربعة طرق تم اعتماد طريقتان و هما:

ا-التكاثف الألدولي:

الدراسات المجرات بينت أنه يمكن الحصول على الفلافونويدات عن طريق التكاثف الألدولي بين 2- هيدروكسي أسيتوفينون مع مشتقات البانزألدهيد في وجود هيدروكسيد البوتاسيوم.

الشكل - 12-

ب–اسألة الفينولات:

O⁻Na⁺ + O C=C HC → O CH CH C O

الشكل – 13–

I– 3– 1– تصنيع الشالكون:

يمكننا الحصول على الشالكونات و ذلك بالتكاثف الألدولي لـ :
2-hydroxyacetophenone مع المشتقات البنزينية الألدهيدية (benzenaldehydes) و ذلك في الوسط الحمضي أو القاعدي. [10]

تحدث عملية تحلق للشالكون و ذلك في الوسط الحمضي الذي يؤدي إلى ظهور الفلافانون وفق تفاعل متوازن (شالكون– فلافانون)، إلا أن هذا التوازن ينزاح بشكل شبه كلي إلى جهة الشالكون و هذا في حالة وجود هيدروكسيل حر في الموقع 4 بالنسبة للشالكون.

التفاعل في الوسط القاعدي يتطلب الشروط التالية:

درجة حرارة التفاعل	تركيز القاعدة	الزمن اللازم للتفاعل
0° م – 20 °م	KOH 50%– 60%	15– 48 ساعة

الجدول-5-

و قد لوحظ أن انعدام مجموعات الميثيل يؤدي إلى مردود جيد.

HO OH MeO Me O + H O 0° - 5° NaH 8 Jours HO OH Me O

الشكل – 14–

من أجل الحصول على الشالكونات ذات مجموعات الميثيل انطلاقا من الفلافانون و ذلك بفتح الحلقة في الوسط القاعدي الكحولي ثم الترسيب بالحمض الممدد و تحت حرارة منخفضة و للحصول على مردود جيد ينبغي عدم وجود هيدروكسيل حر في الوضع 5 بالنسبة للفلافانون.

I– 3–2– تصنيع ثنائي هيدروشالكون:

نتحصل على ثنائي هيدروشالكون وذلك من تكاثف الفينولات مع مشتقات حمض ثنائي هيدرو سيناميك (acide dihydrocinnamique) أو بهدرجة الشالكون أو الفلافانون. [10]

OH O Zn AcOH anhy OH O

الشكل – 15–

I- 3-3- تصنيع الفلافون:

يمكننا الحصول على الشالكونات وفق المخطط التالي:[10]

Br_2 $CaCO_3$

MeOH

Na_2CO_3

EtOH

الشكل - 16-

NBS

CCl_4

	R_1	R_2
A	Ac	H
b	Me	Ac
c	Ac	Me

	R_1	R_2
a	H	H
b	Me	H
c	H	Me

الشكل -17-

1° I_2 AcOH
2° AcONa AcOH anhydrid
3° MeONa

R_1 = Sucre
R_2 = Ac ou Me

R_1 = Sucre
R_2 = H ou Me

الشكل -18-

I- 3-4- تصنيع الفلافانون:

انطلاقا من الشالكون يتم الحصول على الفلافانون و هذا بغلق الحلقة و قد لوحظ أن وجود هيدروكسيل حر في الموضع 6′ بالنسبة للشالكون يؤدي إلى مردود جيد و يمكن أن نذكر أيضا أن الفلافانون المستبدل في الموضع 8 لا يمكن الحصول عليه إلا تحت شروط قاسية. [10]

30h Δ
H_3PO_4 concentre

الشكل - 19-

بعض التفاعلات الخاصة التي تمكننا من الحصول على فلافانون خاص:

HBr/AcOH

	R_1	R_2
A	Bz	Me
b	Me	Bz

	R_1	R_2
a	H	Me
b	Me	H

الشكل – 20–

I- 3-5- تصنيع الفلافونول و الأورون:

الشكل - 21-

لوحظ أن شروط التفاعل و وجود المستبدلات لها تأثير كبير على مردودية التفاعل، فبالنسبة للمستبدلات لوحظ أن وجود هيدروكسيل في الموقع 2 و الموقع 4 بالإضافة إلى مجموعة ميثوكسيل في الموضع ´6 فإن مردود التفاعل يزيد باتجاه الحصول على الفلافونول المطلوب.

أما الشروط المثالية فهي: H_2O_2 5% - 30%، NaOH 20%. [10]

I- 3-6- تصنيع ثنائي هيدرو الفلافونول:

الشكل - 22-

يمكن إجراء الخطوة الثانية من هذا التفاعل في وجود حمض HCl المركز أو يمكن استعمال HCl النقي و حمض الخل البلوري و هذا بوجود BF_3 و الإيثر كمذيب. [10]

I- 3-7- تصنيع الأورون:

الطرق العملية المستعملة تقريبا كلها تعتمد أساسا على تكاثف الكومارين مع الألدهيدات العطرية في وسط حمضي إلا أنه في حالة وجود سكريات كمستبدلات لا يمكن استعمال هذه الطريقة التي تتطلب وجود حمض HCl لذا فإننا نلجأ إلى تفاعلات أخرى. [10]

الشكل - 23-

I- 3-8- تصنيع إيزوفلافون:

الطريقة الأولى:[10]

الشكل -24-

الطريقة الثانية:[10]

1)EtO_2CHOCl
2)H_2O

1)OH^-
2) 200°, Cu
$-CO_2$

–25 – الشكل

الطريقة الثالثة:[30]

$HCHO/CHCl_3$
K_2CO_3/H_2O

$HCHO/CHCl_3$
K_2CO_3/H_2O
$(n\text{-}Bu)_4N^+HSO_4^-$

$Et_2NH/EtOH$

K_2CO_3/H_2O
MeOH

–26 – الشكل

I-4 خصائص و أهمية الفلافونيدات :

ترتبط خصائصها بنوع و قسم الفلافونيد و بحالة وجوده (فلافونيدات حرة ،جليكوزيدية ، كبريتية...) لكن يمكن تلخيص أهمها في النقاط التالية:

- تتغير ألوان الفلافونيدات باختلاف أنواعها فمثلا: الفلافونات ، الفلافونولات و الأورونات تتواجد بألوان تتدرج من الأصفر حتى الأحمر أما الأنتوسيانيدات فلها ألوان متعددة كالأحمر الغامق، البنفسجي و الأزرق.
- تتعلق ذوبانيتها بشكل تواجدها و مستبدلاتها فالفلافونيدات الجليكوزيدية ،الكبريتية و الأنتوسيانيدات تذوب في الماء و الكحول، الفلافونيدات الأجليكونية متعددة الهيدروكسيل تذوب في الكحول(إيثانول، ميثانول، بوتانول) بينما الأقل استبدالا تذوب في الإيثر، خلات الإيثيل، الأسيتون، و بالنسبة للفلافونيدات الأجليكونية متعددة الميثوكسيل فتذوب في المحاليل الأقل قطبية كإيثر البترول و الكلوروفورم[31].

I – 4-1- الدور البيولوجي :

- الفلافونيدات هي العناصر المسؤولة عن إعطاء اللون للنبتة و بصفة خاصة للأزهار مما يمنحها الصفة الجاذبة للحشرات و الطيور التي تنقل حبات الطلع و بذلك تمنح دورة جديدة لحياة هذه النباتات، كما تلعب دور حماية لها إذ تعطي طعما مميزا للنبتة مما يبعد الحشرات الضارة عنها.
- لها دور في مراقبة نمو و تطور النبات و هذا بتفاعلها بطريقة معقدة مع مختلف هرمونات النمو النباتية كما تتكامل فيما بينها لتساهم فيما يسمى بـ:Phytoalexines و هو إنتاج النبتة لأيض يعالج الإصابات التي تسببها البكتيريا و الفطريات[32].
- تحمي نسيج النبات لكونها تمتص الأشعة فوق البنفسجية (250-270 ن.م) و عليه فهي تحمي المواد الأساسية (البروتينات و الأحماض النووية) من الآثار السامة لهذه الإشعاعات[33] ، كما تساعد على الإنقاص من ظاهرة النتح في المناطق الجافة[34].
- تعتبر مركبات ذات صفة حمضية ضعيفة ، ذوابة في القواعد القوية مثل: هيدروكسيل الصوديوم. و يتم هدم معظمها في ظروف قاعدية قوية و هذا بتكسير الحلقة C، من أجل هذا ثبت أنّها ليست سامة للإنسان و الثدييات حيث يتم هدمها على مستوى الأمعاء. فمثلا يتم هدم الكرستين على النحو الموضح في الشكل-27-:

OH OH HO O OH OH O

pH alcaline

OH OH O OH + HO OH OH OH O

$- CO_2$

OH O OH OMe OH O OH HO OH OH

الشكل –27– هدم جزيئة الكرستين

- إن من أهم ميزات الفلافونيدات كونها عناصر ضد مؤكسدة ، و يتمثل فعل ' ضد–الأكسدة ' حسب العالم Halliwell [35] في الفعاليات التالية:
- الإحاطة بـ:ROS (Reactive Oxygen Species) و تثبيطها و هي عناصر أوكسجينية تتولد في الخلية عند دخول أكسجين التنفس إليها و التي تسمى بالجذور الحرة للأكسجين و هي عناصر فعّالة في الجسم لكن ارتفاع نسبة إنتاجها يحدث عدم توازن بين بنائها و هدمها مما يسبب ضررا كبيرا بسبب قدرتها على إتلاف الخلايا و الأنسجة و بالتالي الأعضاء مما يجعلها المسبب الرئيسي لعدة أمراض، لكن الدراسات أثبتت تأثير الفلافونيدات عليها كأعمال Pietta [36]Dugas [37] حيث يرتبط الفلافونيد مع الجذر($R^{\cdot}$) حسب المعادلة التالية:

$$Fl\text{-}OH + R^{\cdot} \longrightarrow Fl\text{-}O^{\cdot} + RH$$

و الجذر الفلافونوكسي ($Fl\text{-}O^{\cdot}$) يمكن أن يتفاعل مع آخر و يعطي صيغة الكينون المستقرة، و يمكن تلخيص ذلك في الشكل -28-:

الشكل -28- تأثير الفلافونيدات على ROS ($R^{\cdot}$)

- تثبيط بعض الأنزيمات كـ:XO (La xanthine oxydase) و الذي يعتبر المصدر البيولوجي الأكثر أهمية للجذر فوق المؤكسد superoxyde

I -4 -2- الدور الفيسيولوجي:

- إنّ لبعض الشوارد المعدنية كـ: Fe^{2+} و Cu^{+} دورا هاما في بعض الوظائف الفيزيولوجية إذ تدخل في تركيب بعض البروتينات المتجانسة Hémoprotéines أو كونها Cofacteurs لمختلف أنزيمات الدفاع الذاتي ضدّ المؤكسد ، لكنّها في نفس الوقت تساعد على إنتاج بعض الجذور الحرّة كما في التفاعل التالي:

$$H_2O_2 + Fe^{2+} (Cu^{+}) \longrightarrow OH^{\cdot} + OH^{-} + Fe^{3+} (Cu^{2+})$$

و لذلك فإنّ ارتباط بعض الفلافونيدات بهذه العناصر يحدّ من إنتاج الجذور الحرّة ، و الشكل-29- يعطي أهم المواقع لتشكل معقدات (complexes) بين الأيونات المعدنية كالحديد و الألمنيوم مع الفلافونيدات[38]:

الشكل –**29**–أهم مواقع المخالب للأيونات المعدنية

I– 4– 3– الدور العلاجي أو الإستشفائي:

- أثبتت الدراسات المكثفة حول الفلافونويدات متعددة الميتوكسيل أن لها فعالية ضد الخلايا السرطانية[39] وهذا من خلال تقوية الجهاز المناعي و ذلك بمساعدته على مقاومة و تدمير الخلايا السرطانية.
- البعض منها له تأثيرات مضادة للالتهاب [40].
- مضادة لارتفاع الضغط[41].
- مضادة للحساسية[42].
- تستعمل أيضا كمسكنات و مدرات للبول و مخفضات لنسبة الكوليسترول[43].
- و قد لوحظ وجود علاقة بين التركيبة الكيميائية للفلافونويد و تأثيراته العلاجية. حيث توصلت الأبحاث إلى أن الزيادة في مجاميع الهيدروكسيل على الحلقة (A) و (B) ينتج عنه زيادة في النشاط المضاد للورم، كما تعتبر الرابطة المضاعفة بين C_2-C_3 ضرورية لإحداث هذا النشاط[44]. أما بعض الفلافونيدات الجليكوزيدية فلها فعالية ضد الفطريات[45]. ، و قد أثبتت دراسات العالم Hanasaki و مساعدوه [46] حول مرض La goutte (و هو مرض ناتج عن ارتفاع نسبة حمض اليوريك في الدم) أنّ بعض الفلافونيدات تؤثر على XO و بالتالي تخفض تركيز حمض

اليوريك مما يساعد على السيطرة على هذا المرض. و قد تأكدت هذه النتائج بأعمال Cos و مساعدوه [47] الذين أثبتوا دور الرابطة C_2 -C_3 بالنسبة للفلافونات و الفلافونولات في تثبيط أنزيم XO بالإضافة إلى العناصر الفعّالة الأخرى و الموضحة في الشكل –30–

الشكل –30–أهم الوظائف الفعّالة في خاصيّة ضدّ الأكسدة



طرق دراسة المركبات الفلافونيدية

II – 1 – طرق الاستخلاص، الفصل و التنقية :

II 1– 1– طرق الاستخلاص :

قبل القيام بعملية الاستخلاص لا بد من تجهيز النبتة المراد إجراء عليها العملية و ذلك بـ :

1. تجفيفها في الظل و بعيدا عن الرطوبة تفاديا للتفاعلات الإنزيمية التي قد تحدث تغيرات على المركبات المراد استخلاصها
2. تنقيتها.
3. طحنها.

قد تستعمل النبتة بجميع أجزائها، كما قد يؤخذ الجزء الهوائي لوحده أو الجذور أو الثمار فقط، و عموما تتواجد الفلافونيدات في الجزء الهوائي؛ إذ في هذا الأخير بالذات يتم الاصطناع الحيوي للفلافونيدات و ذلك لارتباطه بالعامل الضوئي.

ونتم عملية الإستخلاص بنقع الأجزاء النباتية المراد استخلاص الفلافونيدات منها في مذيب مناسب و أكثر المذيبات استعمالا خليط من الكحول / الماء بنسب معينة (3/7) أو (2/8) [48،49 ، 50] في حالة المادة النباتية الجافة، و يفضل الكحول لوحده في حالة المادة النباتية الغضة (الخضراء)، و أغلب الكحولات المستعملة هي الميثانول و الإيثانول.

و تتم عملية الاستخلاص على مراحل :

المرحلة الأولى :

نأخذ الأجزاء النباتية المطحونة و نسكب عليها المحلول الهيدروكحولي على البارد و نتركها لمدة لا تقل عن يوم واحد مع التحريك من حين لآخر، بعدها نرشح و نركز الراشح، تكرر العملية3 مرات أو أكثر و في كل مرة نرشح و نركز الراشح و ذلك بتبخير أكبر كمية ممكنة من المحلول الهيدروكحولي ان الى نتحصل على المستخلص الخام.

المرحلة الثانية :

يؤخذ المستخلص الخام و يعامل بالماء المقطر المغلي ثم يترك مدة ليلة كاملة بعدها يرشح على ورق الترشيح ويحتفظ بالراشح

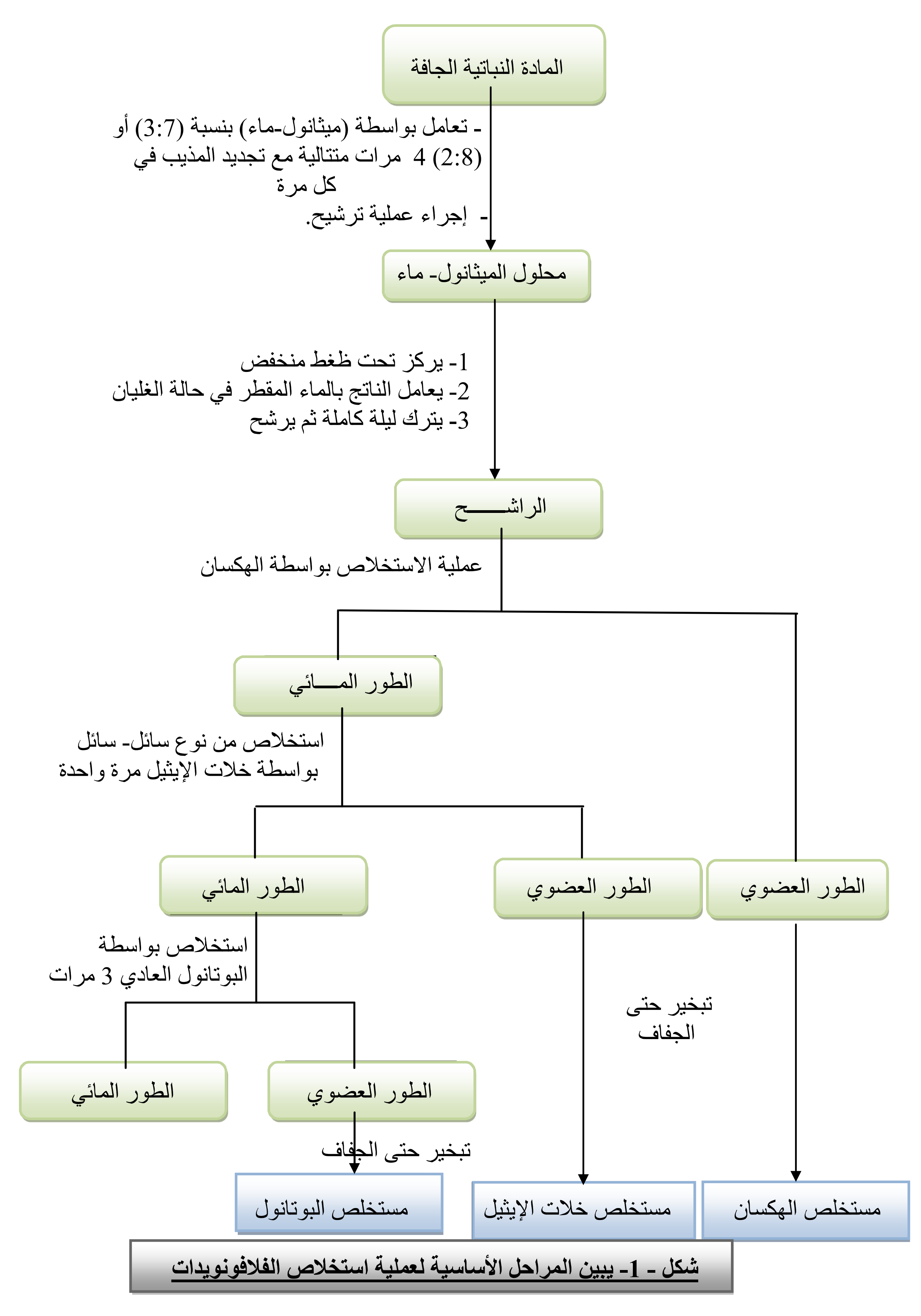
المرحلة الثالثة :

بعد ترشيح المستخلص تركز الرشاحة للتخلص من الكحول المستعمل، ثم يعمد إلى استخلاص انتقائي من نوع سائل/سائل، باستعمال مجموعة من المذيبات منها:

- ✓ بالإيثرالبيترول كي يتم التخلص من المركبات الطبيعية ذات القطبية الضعيفة مثل الدهون و التربينات و الكلوروفيل[.
- ✓ الهكسان العادي(C_6H_6) او ثلاثي كلور الميثان ($CHCl_3$) لاستخلاص الأجليكونات الميثوكسيلية.
- ✓ خلات الإيثيل (AcOEt) لاستخلاص الأجليكونات متعددة الهيدروكسيل و الإيتيروزيدات أحادية السكر .
- ✓ البوتانول النظامي (n-ButOH) في استخلاص الإيتيروزيدات عديدة السكر.

و هذين الأخيرين من أكثر المذيبات استعمالا.

ويمكنتلخيص هذه المراحل في المخطط التالي:



شكل - 1- يبين المراحل الأساسية لعملية استخلاص الفلافونويدات

II-1-2- طرق الفصل :

التقنية الأساسية المستعملة لذلك هي الكروماتوغرافيا بمختلف أقسامها، حيث تستعمل كلمة كروماتوغرافيا للإشارة إلى تقنيات فصل مختلفة، تعتمد جميعها على توزيع المادة تحت الدراسة بين طورين أحدهما ثابت و الآخر متحرك، و الطور الثابت قد يكون جامدا أو سائلا محملا على الدعامة الجامدة، أما الطور المتحرك فعادة يكون سائلا عضويا[51].

إن هدف الفيتوكيميائي هو الحصول على مركبات نقية لأجل ذلك يستعمل طرق فصل متتالية أهمها:

- ✓ كروماتوغرافيا العمود (CC).
- ✓ كروماتوغرافيا الورق(CP).
- ✓ كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة(CCM).
- ✓ كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء(HPLC).

II-1-2- 1- كروماتوغرافيا العمود(CC) :

هي طريقة كلاسيكية، الهدف منها هو فصل خليط معقد من المركبات الفلافونيدية و يستعمل لهذا الغرض كدعامة ثابتة :

- ✓ السيليكاجال يستخدم لفصل الفلافونيدات الأقل قطبية.
- ✓ السيليلوز و أثبت فعاليته في فصل الفلافونيدات الغليكوزيدية عن تلك المجردة من السكر.
- ✓ .متعدد الأميد الذي لقي تطبيقا واسع النطاق في فصل الفلافونيدات الغليكوزيدية بعضها عن بعض.

و يتلخص طريق إجراء هذه التقنية فيما يلي:

- يؤخذ العمود الزجاجي الذي تختلف أبعاده باختلاف كمية المستخلص و يثبت بواسطة حامل و يعبأ بالطور الثابت المشبع بالمذيب الأقل قطبية.

– بعد ترصيص الطور الثابت جيدا داخل العمود توضع طبقة من رمل خاص يدعى

Sable de fontaine bleau بسمك 0.5 سم، بعدها تحضر العينة حيث يذاب المستخلص المراد فصله في أقل كمية ممكنة من الميثانول، و بواسطة ماصة باستور يتم وضعه على سطح الرمل مع الحرص على عدم إتلافه،أو بإتباع طريقة أخرى و التي تستعمل في حالة ما إذا تطلبت إذابة المستخلص الجاف كمية كبيرة من الميثانول، ففي هذه الحالة نضيف لمحلول المستخلص كمية من الجال و نركز هذا الخليط حتى نحصل على مسحوق جاف الذي يضاف إلى العمود الكروماتوغرافي، بعد ذلك يضاف المملص الذي يكون في البداية مذيب أقل قطبية ثم ترفع قطبيته بإضافة مذيب قطبي تدريجيا إلى غاية الوصول إلى قطبية عالية، و يتم مراقبة الحزم باستعمال مصباح الأشعة فوق البنفسجية UV حيث تستقبل أسفل العمود و تركز حتى الجفاف.

II- 1-2-2 كروماتوغرافيا الورقة التحضيرية (CP)

تعد من أفضل التقنيات المستعملة لفصل الفلافونيدات خاصة القطبية كالفلافونيدات السكرية [52] كما تستعمل على المستخلص مباشرة في حالة عدم غناه بالمركبات الفلافونيدية أو لجمع و فصل الكسور المحصل عليها من العمود الكروماتوغرافي.

الدعامة المستخدمة في هذه التقنية هي ورق واتمان رقم 3(Papier Whatman3) و تتم العملية كالتالي:

- تحضير الورقة بأبعاد تتلاءم مع الحوض(La cuve).
- وضع المستخلص بواسطة ماصة باستور على كامل عرض الورقة على بعد 2 سم عن الهامش.
- تترك الورقة لتجف ثمّ تغمس في المملص الذي يبدأ في إنزال الحزم تسلسليا.
- تستمر العملية من 8 إلى 16 ساعة حسب نوع المملص ، نخرج بعدها الورقة لتجف.
- يتم تحديد الحزم بمصباح الأشعة فوق البنفسجية ثمّ تقص الحزم إلى قطع صغيرة و توضع في الميثانول المغلي، بعدها ترشح و تركز الرشاحة.
- في حالة الحصول على مركب نقي تتوقف العملية و إلاّ تستمر بنفس التقنية أو بتقنيات أخرى.

و أهم المذيبات المستعملة في هذه التقنية:

✓ حمض الخل بتراكيز مختلفة من 5 إلى 70 ٪ (من 6 إلى 8 ساعات)

✓ 5 / 1 / 4 : (الماء / حمض الخل / البوتانول العادي) B.A.W (16–18سا).

- ✓ 1 / 1 / 3 : (الماء / حمض الخل / البوتانول الثالثي) T.A.W .
- ✓ 3 /10/ 30 : (حمض الكلور / الماء / حمض الخل) Forestal (15ساعة).
- ✓ 2 / 1 /4 : (الماء / الإيثانول /البوتانول العادي) B.E.W .
- ✓ 1 / 1 : (البوتانول العادي / حمض الكلور2N) (24 ساعة).

كما يمكن استعمال كروماتوغرافيا الورق التحضيرية ذات البعدين إذا كان البعد الواحد غير كاف لفصل الخليط فصلا كاملا.

حيث يكون البعد الأول عمودي على البعد الثاني، فبعد إجراء البعد الأول تسحب الورقة و تترك لتجف ثم تدار بمقدار 90° و تغمس في مذيب آخر، حيث يكون البعد الأول عادة عضوي مثل الطبقة العضوية للنظام BAW و البعد الثاني مائيا كالنظام $ACOH/H_2O$.

BAW: الماء المقطر : حمض الخل : البيوتانول العادي.

5 1 4

$ACOH/H_2O$: الماء المقطر : حمض الخل

75 25

II- 1 – 2 – 3 – كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة(CCM) :

نقوم بتحضير الدعامة بالرّج الجيّد لمتعدد الأميد مع الإيثانول ، السيليكاجال أو السيليلوز مع الماء المقطر ثمّ نضعها بواسطة Etaleur على صفائح من زجاج أو بلاستيك (20×20سم) بسمك منتظم و نتركها تجف ثم نضعها في درجة حرارة 100°م على الأقل لمدة ساعة بالنسبة للسيليكاجال و السيليلوز. بعد أن تبرد نضع عليها العينة بطريقة عرضية على بعد 1.5 سم من خط الانطلاق ونغمسها عموديا في حوض به المملص المناسب و بانتشار هذا الأخير تفصل المركبات على شكل أحزمة نحددها بمصباح UV .نقوم بكشط كل منها على حدى و نغسلها بالميثانول جيّدا في أقماع زجاجية ، تركز بعدها الرشاحة و تفحص لمعرفة درجة نقاوتها.

و تعد هذه التقنية الأكثر استعمالا لتعدد ميزاتها كسرعتها حيث تستغرق من 30 دقيقة إلى 3 ساعات و حساسيتها حيث يمكن الحصول على كميات برتبة 1 إلى 100 مغ كما لا تستهلك كميات كبيرة من المذيبات و الأنظمة المستعملة كمملصات هي :

بالنسبة لمتعدد الأميد (كدعامة صلبة) :

H_2O / MeOH / MEC / Acétylacétone : (13 /3 / 3 / 1)

Toluène / MEC / MeOH : (4 / 3 / 3)

MeOH / H_2O / AcOH : (18 / 1 / 1)

أما بالنسبة لـ : السيليكاجال (كدعامة صلبة) فهي ملخصة في الجدول (1)[53]:

نوع الفلافونويد	المملص
Flavonoides aglycones	EtOAc–i-PrOH–H2O, 100:17:13 EtOAc–$CHCl_3$, 60:40 $CHCl_3$–MeOH, 96:4 Toluène–$CHCl_3$–MeCOMe, 8:5:7 Toluène–HCOOEt–HCOOH, 5:4:1 Toluène–EtOAc–HCOOH, 10:4:1 Toluène–EtOAc–HCOOH, 58:33:9 Toluène–EtCOMe–HCOOH, 18:5:1 Toluène–dioxane–HOAc, 90:25:4
Flavonoides glycosides	n-BuOH–HOAc–H2O, 65:15:25 n-BuOH–HOAc–H2O, 3:1:1 EtOAc–MeOH–H2O, 50:3:10 EtOAc–MeOH–HCOOH–H2O, 50:2:3:6 EtOAc–EtOH–HCOOH–H2O, 100:11:11:26 EtOAc–HCOOH–H_2O, 9:1:1 EtOAc–HCOOH–H_2O, 6:1:1 EtOAc–HCOOH–H_2O, 50:4:10 EtOAc–HCOOH–HOAc–H_2O, 100:11:11:26 EtOAc–HCOOH–HOAc–H_2O, 25:2:2:4 THF–Toluène–HCOOH–H_2O, 16:8:2:1 $CHCl_3$–MeCOMe–HCOOH, 50:33:17 $CHCl_3$–EtOAc–MeCOMe, 5:1:4 $CHCl_3$–MeOH–H_2O, 65:45:12 $CHCl_3$–MeOH–H_2O, 40:10:1 MeCOMe–butanone–HCOOH, 10:7:1 MeOH–butanone–H_2O, 8:1:1
Flavonoides glucuronides	EtOAc–Et_2O–dioxane–HCOOH–H_2O, 30:50:15:3:2 EtOAc–EtCOMe–HCOOH–H_2O, 60:35:3:2
Flavanones aglycones	CH_2Cl_2–HOAc–H_2O, 2:1:1
Flavanones glycosides	$CHCl_3$–HOAc, 100:4 $CHCl_3$–MeOH–HOAc, 90:5:5 n-BuOH–HOAc–H2O, 4:1:5 (la couche supérieur)

جدول –1 : الأنظمة المستعملة كمملصات بالنسبة لالسليكاجال

نوع الفلافونويد	المملص
Chalcones	EtOAc–hexane, 1:1
Isoflavones	$CHCl_3$–MeOH, 92:8 $CHCl_3$–MeOH, 3:1
Isoflavones glycosides	n-BuOH–HOAc–H_2O, 4:1:5 (couche supérieure)
Dihydroflavonoles	$CHCl_3$–MeOH–HOAc, 7:1:1
Biflavonoides	$CHCl_3$–MeCOMe–HCOOH, 75:16.5:8.5 Toluène–HCOOEt–HCOOH, 5:4:1
Anthocyanidines et anthocyanines	EtOAc–HCOOH–2 M HCl, 85:6:9 n-BuOH–HOAc–H_2O, 4:1:2 EtCOMe–HCOOEt–HCOOH–H_2O, 4:3:1:2 EtOAc–butanone–HCOOH–H_2O, 6:3:1:1
Proanthocyanidines	EtOAc–MeOH–H_2O, 79:11:10 EtOAc–HCOOH–HOAc–H_2O, 30:1.2:0.8:8

جدول –2–الأنظمة المستعملة كمملصات بالنسبة لالسليكاجال(تابع)

II-1– 2 – 4 – كروماتوغرافية نظام السائل عالي الآداء(HPLC)

تسمح هذه التقنية بتحديد المحتوى الفينولي للعينة المراد تحليلها، و هي نوع من أنواع التحليل الكروماتوغرافي التجزيئي الذي يتطلب استخدام ضغوط عالية لدفع المذيب خلال العمود، و هي التقنية الأفضل لفصل و تحليل الخلائط المعقدة في وقت قصير [54] ، و أهم المذيبات المستعملة هي :

- ✓ المذيب 1 : الماء / الأسيتونتريل / حمض الخل : (900 / 100 / 40).

- ✓ المذيب 2 : الماء / الأسيتونتريل / حمض الخل : (200 / 800 / 40).

– يجر المملص معه المركبات في العمود بصفة انتقائية فتنزل المركبات ثنائية السكر قبل أحادية السكر؛ و هذه الأخيرة قبل الأجليكونات [55]

– و بالنسبة للأجليكونات التي تحتوي على الأكسجين في الحلقة B فيملص المركب الذي يحتوي على ثلاث مجموعات (OH) في الحلقة B قبل الذي يحتوي على مجموعتي (OH) و هذا الأخير قبل الذي يحتوي على (OH) واحدة دائما على الحلقة B [56] .

II-1-3-التنقية :

من أجل تنقية المركبات المفصولة بالتقنيات الكروماتوغرافية السابقة تنقية جيدة، و الهدف منها هو التخلص من الشوائب العالقة بالمركبات المعزولة (متعدد الأميد، سيليلوز ... الخ) و للحصول على نتائج جيدة نستعمل عمود بطول 20سم و قطر 1سم ثم نتبع الخطوات التالية :

II-1-3-1-التنقية على عمود من متعدد الأميد SC_6:

يتم مزج متعدد الأميد SC_6 بالطولوين، ثم يصب في العمود الكروماتوغرافي و بعد استقرار المزيج فيه يوضع المركب المفصول و المذاب في اقل كمية من الميثانول على سطح الدعامة. بعد توضعه يغسل بالطولين ثم يغير المملص تدريجيا بإضافة الميثانول حتى يتم نزول المركب كليا.

II-1-3-2-التنقية على عمود من السيفاداكس :

تستعمل هذه التقنية في المراحل الأخيرة من عمليات الفصل و التنقية. و لتحقيق عمود من Sephadex LH20 يتم نقع جال السيفاداكس في الميثانول، ثم يصب المزيج بلطف في العمود، و بعد استقراره يتم وضع المركب المفصول و المذاب في أقل كمية ممكنة من الميثانول على السطح بعناية، يملص بعدها بدفعات متتالية من الميثانول، حيث يخرج المركب أسفل العمود نقيا و جاهزا لمختلف الدراسات البنيوية.

II-2-الدراسة البنيوية للمركبات الفلافونويدية :

التحليل البنيوي للفلافونيدات لا يمكن أن يتم إلا على المركبات النقية، بحيث يتطلب ذلك تقنيات فيزيوكيميائية لتحديدها مثل مطيافية الكتلة، مطيافية الرنين النووي المغناطيسي و مطيافية الأشعة فوق البنفسجية باستخدام كواشف خاصة.

II2-1-اللون الإستشعاعي تحت مصباح UV :

اللون الإستشعاعي للمركبات تحت مصباح الأشعة فوق البنفسجية (lumière de Wood) يمثل المرحلة الأولية للتحليل، ويلعب دورا مهما في التحديد البنيوي للمركبات الفلافونيدية والجدول التالي يلخص بعض منها : [57،56]

لون المركب تحت أشعة UV	نوع الفلافونيد
بنفسجي–أسود.	. فلافون. . 5،6،7 أو 5،7،8 ثلاثي هيدروكسيل فلافون. . فلافونول مستبدل في الموضع 3. . بعض الشالكونات.
بنفسجي–نيلي.	. فلافونول أو فلافانول يملك هيدروكسيل في الموضع3. . فلافون أو فلافانون دون OH في الموضع5. . فلافونول مستبدل في 3 أو دون OH في الموضع 5.
أصفر أو أصفر باهت.	. فلافونول مع OH حر في3 و/أو دون OH حر في 5.
برتقالي لامع.	.إيزوفلافون.
أصفر مخضر.	. أورون.
أخضر.	. بعض الشالكونات.
أزرق مخضر.	. فلافانون دون OH في الموضع 5.
أزرق فاتح (مشع)	. فلافون دون OHحر في الموضع 5 .فلافونول دون OHحر في الموضع 5 مع 3-OH مستبدل

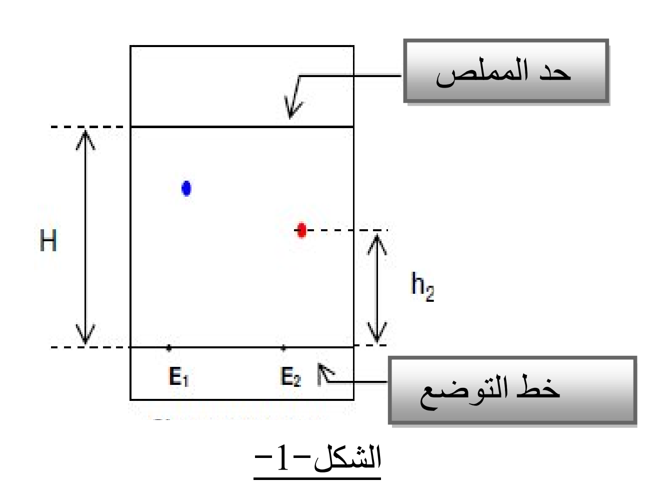
الجدول (3): اللون الإستشعاعي للفلافونيدات تحت مصباح UV

II-2-2-معامل الإنحباس: R_f:

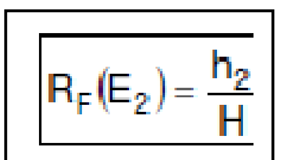
من خلال قيم معامل الانحباس R_f في نظام مذيب معين يمكن معرفة طبيعة الفلافونيد الذي بحوزتنا .

و يعرف هذا الأخير (أي R_f) بأنه النسبة بين المسافة المقطوعة من طرف المركب انطلاقا من نقطة البداية والمسافة المقطوعة من طرف المذيب من نفس النقطة، و هو قيمة مميزة لكل مركب في شروط كروماتوغرافية معينة (درجة الحرارة، المذيب،...) و ترتبط قيمة R_f بطبيعة المجموعات الاستبدالية على المركب [58] , [59]

.



الشكل-1-



$$R_F(E_2) = \frac{h_2}{H}$$

$$R_f = \frac{\text{المسافة المقطوعة من طرف المركب انطلاقا من نقطة البداية[h]}}{\text{المسافة المقطوعة من طرف المملص (المذيب) من نفس النقطة [H]}}$$

و يتم قياس R_f للمركبات النقية عادة في ثلاث أنظمة لمذيبات مختلفة :

النظام 1 : (4 / 3 / 3) : Toluène / méthanol / méthyléthylcétone

النظام 2 : (13 / 3 / 3 / 1) : eau / méthanol / méthyléthylcétone / Acétylacétone

النظام 3 : Acide acétique: 15 %

ومن خلال قيم R_f في مختلف الأنظمة يمكن معرفة ما إذا كان المركب أجليكونا أو إيتيروزيدا، كذلك معرفة

ما إذا كان أحادي، ثنائي أو ثلاثي السكر [58] [60] .

فمثلا :

قيمة R_f تزداد لأن مجموعات الهيدروكسيل الحرة قليل في نظام مذيب عضوي، و العكس في نظام مذيب مائي [59] .

إذا كان المذيب مستبدل بسكر واحد أوأكثر ، فإن قيمة R_f تزداد في نظام مائي و تنقص في نظام عضوي و

الجدول التالي يبين العلاقة بين Rf و البنية الفلافونويدية:

البنية الفلافونودية	قيـــــم R_f
الزيادة في مجاميع OH	♦ نقصان قيم R_f في الأنظمة العضوية ♦ زيـادة قيم R_f في الأنظمة المائيـة
استبدال OH بـ OMe	♦ زيـادة قيم R_f في الأنظمة العضوية ♦ نقصان قيم R_f في الأنظمة المائيــة
إدخال مجموعة السكر	♦ نقصان قيم R_f في الأنظمة العضوية ♦ زيـادة قيم R_f في الأنظمة المائيـة

الجدول-4- العلاقة بين *Rf* و البنية الفلافونويدية

II-2-3-مطيافية الأشعة فوق البنفسجية:

الفلافونويـدات واحـدة مـن المركبـات القـادرة علـى امتصـاص الأشـعة فـوق البنفسـجية، و ذلـك لاحتوائهـا علـى مجموعات مسؤولة عن ذلك تدعى بـ chromophores (و هذه الأخيرة عبارة عن مواقع غنية بالإلكترونات كما قد تكـون عبـارة عـن مجموعـات كيميائيـة مثـل مجموعـة الهيدروكسـيل" OH" و مجموعـة الميتوكسـيل "OCH_3 "...).

و تعتبـر مطيافيـة الأشـعة فـوق البنفسـجية مـن أهـم الوسـائل المسـتعملة للتعـرف علـى البنيـة الكيميائيـة للمركبـات الفلافونيدية، و قد نشرت أبحاث كثيرة بهذا الصدد [63،62،29،25،56]

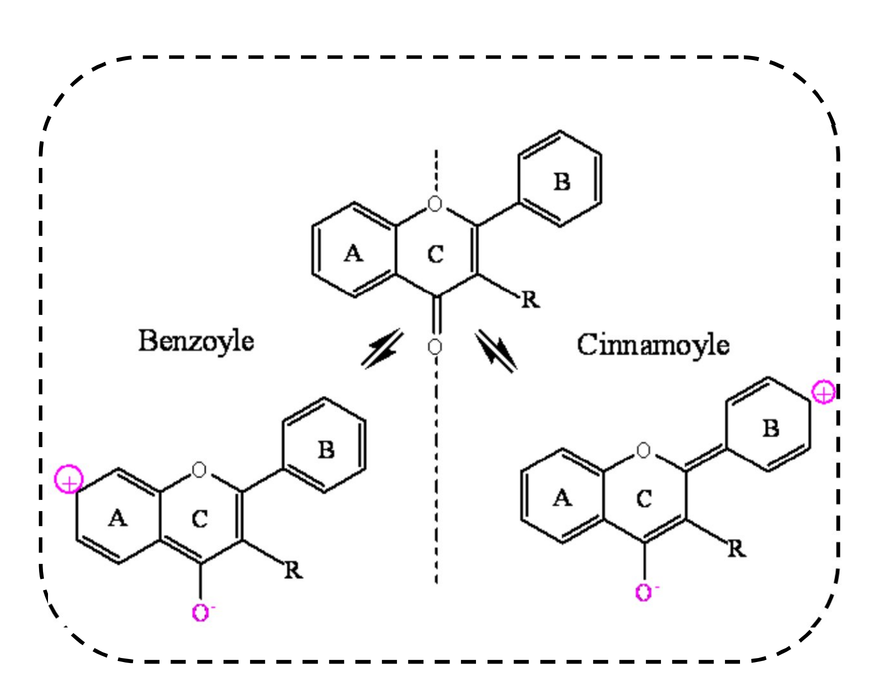
و تكمن أهميتها في انها:

- لا تحتاج إلى كمية كبيرة من المركب لإنجازها (0،1 ملغ).
- سهولة و سرعة تحقيقها.
- تعطي معلومات معتبرة عن البنية المحتملة للمركب.

ويعتمد أساس هذه التقنية في كون كل مركب فلافونويدي له طيف امتصاص مميز و خاص في الوسط الميثانولي، و يتغير هذا الطيف بإزاحات معينة بعد إضافة كواشف معروفة إما قواعد (هيدروكسيد الصوديوم NaOH، خلات الصوديوم NaOAc) أو أحماض لويس ($AlCl_3$ كلوريد الألمنيوم، حمض البوريك H_3BO_3) حيث أن طبيعة الكاشف و تأثيره على طيف الامتصاص يوفران معلومات حول بنية المركب في الموقع (5) [64].

II-2-3-1- طيف إمتصاص الميثانول:

يعطي طيف الفلافونيدات الحاوية على مجموعة كربونيل في C_4 (فلافون، فلافونول)، عصابتين I و II [65] تبعا للشكل الموالي :



الشكل -2- ترافق مجموعة الكربونيل مع الحلقتين البنزينيتين A و B

العصابة I : ذات قيمة امتصاص عظمى في حدود (300-400 nm)، وهي راجعة إلى امتصاص الصورة Cinnamoyle الناتج عن ترافق مجموعة الكربونيل C_4 مع الرابطة الثنائية والحلقة B. إذ تسمح بتمييز الفلافونول عن الفلافون وتعطي معلومات عن التغيرات البنيوية للحلقتين B و C [67].

العصابة II : ذات قيمة امتصاص عظمى في حدود (250-280 nm)، وهي ناتجة عن الشكل Benzoyle الناجم عن ترافق مجموعة الكربونيل مع الحلقة العطرية A. وهذا ما يمكننا من الكشف عن الهياكل الفلافونيدية المختلفة.

يعتمد مكان الحزمتين على عدد وموقع مجموعات الهيدروكسيل البديلة، فمن الملاحظ أنه كلما زادت مجاميع الهيدروكسيل، فإن حزمة الامتصاص تزداد إلى طول موجي أعلى "انزياح باتوكرومي". وعند استبدال مجموعات الهيدروكسيل بمجموعات ميتوكسيل، أو وحدات سكر تزاح حزمتا الامتصاص إلى طول موجي أقل "انزياح هيبسوكرومي" [66].

و الجدول-5- يبين مجالات امتصاص الفلافونيدات من خلال UV-vis (في الميثانول).

العصابة I (nm)	العصابة II (nm)	نوع الفلافونويد
350 – 310	280 – 250	فلافون
360 – 330	280 – 250	فلافونول3-OH مستبدل
385 – 350	280 – 250	فلافونول 3-OH حر
330 – 310	275 – 245	ايزوفلافون
330 – 300	295 – 275	فلافانون وdihydroflavonol
390 – 340	270 – 230 شدة منخفضة	شالكون
430 – 380	270 – 230 شدة منخفضة	اورون
560 - 465	270 – 230	انثوسيانيدين و انثوسيانين

الجدول-5-: مجالات امتصاص الفلافونيدات من خلال UV-Vis (في الميثانول).

II-2-3-2-طياف الإمتصاص في وجود الكواشف :

بإضافة كواشف معينة إلى محلول الميثانول مثل: NaOH ، NaOAc أو $AlCl_3$+HCl يمكننا من التعمق أكثر في الدراسة البنيوية حيث تتضح لنا مستبدلات الهيكل الفلافونويدي.

فالمعلومات المستخلصة من طيف امتصاص الميثانول تكون مكملة للتي تعطيها لنا الأطياف المأخوذة بوجود هذه الكواشف، لأنها في الغالب تعطي ألوانا مميزة إذا ما أضيفت إلى المحلول الميثانولي.

هذه الألوان تظهر نتيجة تغير مكان امتصاص حزم طيف UV و ذلك بسبب تكوين معقدات مع تلك الكواشف.

ا- في وجود NaOH:

NaOH : هي عبارة عن قاعدة قوية تؤين كل هيدروكسيلات الفلافونويد، و إضافتها لـ (مركب + ميثانول) تحدث إزاحة باثوكرومية لكل الطيف، أي إنزياح في اتجاه (λ) الطويلة و يظهر تأثيرها خاصة على العصابة (I) أشد منه على العصابة (II) مما يؤدي إلى انزياح بمقدار [+40 إلى +65 نم] بدون نقصان في الشدة الضوئية ما يبين وجود مجموعات OH حرة خاصة في المواقع '4، 3 و 7.

ب- في وجود NaOAc :

NaOAc : هي قاعدة ضعيفة لذا فهي تؤين مجموعات الهيدروكسيل الأكثر حامضية فقط C_3،C_4 و C_7، و تعتبر كاشف نوعيا لهيدروكسيل الموقع (C_7) ، و يظهر ذلك جليا على العصابة (II) للطيف المسجل إذ انه يحدث فعل باثوكرومي [+5 إلى +20 نم] للعصابة (II)، و يشير ذلك إلى وجود OH حر في الموضع C_7.[69]

ج- في وجود H_3BO_3 +NaOAc

يضاف H_3BO_3 على العينة في وجود NaOAc للكشف عن أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقةB في الموقع '3، '4 بالانزياح الباثوكرومي للعصابة I (12–36 ن.م) [58]، و يلغى في حالة استبدال أحدهما. و على الحلقة A في المواقع 6،7 أو 7،8 من خلال المعقدات التي يشكلها، و الفعل الذي يظهره هو فعل باثوكرومي للعصابة I مقارنة بالطيف المسجل في الميثانول [68].

الشكل – 3– المعقد المتشكل بين الفلافونويد و خليط ($NaOAc + H_3BO_3$)

د- في وجود $AlCl_3$:

يشكل $AlCl_3$ معقدات ثابتة بين كربونيل الموضع 4 و هيدروكسيل الموضع 3 أو(و) الموضع 5 في الوسط الحمضي أي بعد إضافة HCl، و معقدات غير ثابتة في الوسط الحمضي مع المركبات المحتوية على مجموعتي هيدروكسيل حرة في ('3 ، '4)؛ (7 ، 8)؛ (6 ،7).

في وجود $HCl+AlCl_3$:

يشكل $AlCl_3$ مع الكربونيل C_4 و هيدروكسيل الموقع C_3 أو الموقع C_5 معقدات و كذلك مع أرثو ثنائي الهيدروكسيل، إلا أن الأول معقد ثابت و الثاني غير مستقر في الوسط الحمضي.
التحليل يبدأ أولا بمقارنة الطيف المسجل في الميثانول MeOH مع الطيف المسجل في ($AlCl_3$ + HCl) و في حالة و جود انزياح باتوكرومي للعصابة (I) يدل على وجود هيدروكسيل في الموقع C_3 أو C_5 .

في المرحلة الثانية تتم مقارنة الطيف المسجل في وجود ($AlCl_3$+HCl) مع الطيف المسجل في وجود $AlCl_3$ ففي حالة وجود انزياح هيبسوكرومي للعصابة (I) بعد إضافة HCl إلى طيف $AlCl_3$ دل على وجود أورثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة A أو B ، و هذا ما سيوضحه المخطط الأتي: [56]

شكل–4– المعقدات الثابتة و الغير ثابتة بين الفلافونيد و $AlCl_3$ قبل و بعد اضافة HCl

شكل –5– المعقدات الثابتة و الغير ثابتة بين الفلافونيد و $AlCl_3$ قبل و بعد اضافة HCl (تابع)

والجدول التالي يلخص قيم إزاحات الإمتصاص الخاصة بالفلافونيدات في وجود الكواشف المختلفة.

ملاحظة:

(+) : باتوكروم ؛ (–) : هبسوكروم ؛ / : بالنسبة Ep: نتوء

المفاعلات	الإزاحة الملاحظة بـ (nm)		التحليل الموجه
	الحزمة I	الحزمة II	

MeOH	350 . 304	280 . 250	فلافون
	385 . 352	280 . 250	فلافونول
	357 . 328	280 . 250	OR في الموضع 3
	320^{Ep}	275 . 245	إيزوفلافون
NaOMe (NaOH)	+45 إلى +65 1 . استقرار الشدة الضوئية/MeOH 2 . نقصان الشدة الضوئية/MeOH		OH في 4' OR في 4'، OH في 3
	استمرار النقص في الشدة الضوئية، طيف يتحلل مع الوقت		OH في 3، 4' أو Orthodi-OH على الحلقة A مثلاً 7، 6 أو 8، 7 أو Orthodi-OH على الحلقة B
	استمرار النقص في شدة الامتصاص مع تفكك سريع للطيف		Tri OH 3'، 4'، 3 أو Tetra OH في 3، 3'، 4'، 5'
	عصابة جديدة بين 320 . 335		OH في 7
NaOAc		+5 إلى +20	OH في 7 مع ملاحظة أن هذا الانزياح يتراجع في وجود مستبدلات 6 أو 8
		عدم وجود أي انزياح أو ظهور انزياح ضعيف	OR في 7
		طيف يتفكك بمرور الزمن	Di OH في 7، 6 أو 8، 7 أو 4، 3 Tri OH في 7، 6، 5 أو 8، 7، 5 أو 4'، 3'، 3

NaOAc + H_3BO_3	+12 إلى +36		Orthodi OH على الحلقة B
MeOH/ NaOAc + H_3BO_3		+10 - 15	Orthodi OH على الحلقة A (6–7 أو 7–8) إيزوفلافون
$AlCl_3$	قمة وحيدة عند 420 . 430		Orthodi OH على الحلقة B (فلافون) مع OH في 5
	قمة وحيدة عند 440 . 460		Orthodi OH على الحلقة B (فلافونول) مع OH في 5
MeOH/ $AlCl_3$ +HCl	+17 إلى +20		5-OH مع مجموعة أكسجينية في 6
	+35 إلى +55		OH في 5 فلافون و OCH_3 في 3 فلافون
	+50 إلى +60		OH في 3 مع أو عدم وجود OH في 5
		+10–14	OH في 5 إيزوفلافون
$AlCl_3$/ ($AlCl_3$+ HCl)	–20 إلى –40 مع نتوء أو قمة من [350 . 360]		Orthodi OH على الحلقة B
	–20 إلى –25		إمكانية وجود Orthodi OH على الحلقة A أكثر من Orthodi OH على الحلقة B أو Tri OH على الحلقة B

<u>الجدول– 6 – التأثيرات المختلفة للكواشف على طيف الأشعة فوق البنفسجية</u>

II– 2-4– مطيافية الرنين النووي المغناطيسي:

يعتبر طيف الرنين النووي المغناطيسي RMN من أهم الطرق المتاحة للحصول على التركيبة الكيميائية للمركبات و توجد عدة تقنيات هي :

- طيف RMN للبروتون ^{1}H

- طيف RMN للكربون ^{13}C

كما ظهرت للوجود تقنيات جديدة أمكن بها الجمع بين أطياف البروتون ^{1}H و الكربون ^{13}C للحصول على طيف ثنائي البعد، و يمكن بهذه التقنيات معرفة:

- درجة تأكسد الحلقات A, B, C
- عدد مجموعات الميتوكسيل
- عدد السكريات و نوع الرابطة α أو β.

II-2-4-1 مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون RMN-^{1}H:.

في الرنين النووي المغناطيسي للبروتون توضع الجزيئات تحت تأثير مجال مغناطيسي خارجي ،فيحدث انفصال لمستويات الطاقة الفردي الخاص بالحركة المغزلية لأنوية ذرات الهيدروجين إلى مستويين، ويزداد الفرق في الطاقة (δE) بين هذه المستويات بزيادة شدة المجال المغناطيسي الخارجي ،كما أن هذا الفرق في الطاقة لكل نوع من أنوية الهيدروجين يتوقف على الظروف الإلكترونية المحيطة بكل نواة والتي تحدد بنوع الرابطة ونوع الذرات الأخرى المرتبطة بهذه النواة، فأنوية ذرات الهيدروجين تمتص طاقة الأشعة الكهرومغناطيسية على ترددات مختلفة وهو ما يعبر عنه بالانتقال الكيميائي (δ)، فتظهر عدة إمتصاصات يتوقف عددها على عدد أنوية الهيدروجين المختلفة في الجزيئ .

كثافة الامتصاص لكل نوع من الهيدروجين تتناسب مع عدد الذرات الموجودة في هذا النوع. و بالتالي يمكن تحديد العدد النسبي لذرات الهيدروجين في الجزيئ وكذا عددها في كل مجموعة .

يلاحظ أيضا حدوث انقسامات داخلية في كل امتصاص رئيسي ويتوقف عدد هذه الانقسامات على عدد ذرات الهيدروجين المجاورة، والفرق في الطاقة بين هذه الانقسامات بوحدة التردد يسمى ثابت التزاج(*J*) [69].

يتم الحصول على طيف RMN-^{1}H باستعمال مذيبات مختلفة مثل $CDCl_3$ الذي يعطي نتائج جيدة مع الفلافونويدات غير القطبية و مذيب CD_3OD و DMSO-d_6 الذي يعطي نتائج جيدة مع معظم الغليكوزيدات و الجليكونات [43].

أ– بروتونات الحلقة العطرية A :

من أجل الحلقة A ثنائية الإستبدال في الموقعين 5 و 7، البروتونين H-6 و H-8 يظهران في شكل ثنائيتين.

حيث يظهر البروتون H-6 عند (6 حتى 7.1 ppm) بثابت تزاوج *J*= 2.5Hz

و حسب طبيعة مستبدلات C-5 و C-7 إشارة البروتون H-8 تظهر دائما في المجالات أضعف (6.3−6.50 ppm) من تلك الخاصة بالبروتون H-6 [70].و والجدول التالي يبين بعض قيم الانزياح لبروتونات الحلقة A.

الفلافونيد	H-5	H-6	H-8
5,7- OH	-	*d* (*J*=2.5Hz) 6.0-7.1ppm	*d* (*J*=2.5*Hz*) 6.3-6.5*ppm*
5-OH, 7-OR (R = sucre)	-	*d* (*J*=2.5Hz) 6.2-6.4ppm	*d* (*J*=2.5*Hz*) 6.5-6.9ppm
5,6,7- OR (R = H, sucre)	-	-	*s* (*6.3*ppm)
5,7,8- OR (R = H, sucre)	-	*s* (6.3ppm)	−
7-OR (R=H;sucre)	*d*(J=9Hz 8.0ppm	*dd*(J=9Hz;2.5Hz 6.7-7.1ppm	*d*(J=2.5Hz) 6.7-7.0ppm

الجدول-7-إزاحة و ثابت تزاوج بروتونات A في بعض الفلافونيدات

ب− بروتونات الحلقة العطرية B :

- الإنزياح الكيميائي لبروتونات الحلقة B تظهر بين(6.7 ppm - 7.9)، حيث يرتكز هذا الإنزياح على مستبدلات الحلقة B ودرجة أكسدة الحلقة C.
- في حالة الحلقة B أحادية الاستبدال في الموضع 4'، البروتونات $H_{2'}$، $H_{3'}$، $H_{5'}$ و $H_{6'}$ تظهر في شكل ثنائيتين على شكل نظام AB بثابت تزاوج متماثل (8.5Hz).
- دائما يظهر البروتونين H-2’ و H-6’ في المجالات الأدنى من تلك الخاصة بالبروتونات$H_{3'}$ و$H_{5'}$، قيم انزياحها على الترتيب (7.7-8.1 ppm) و (6.5- 7.1 ppm) في حالة kaempférol و apigénine على سبيل المثال. والجدول الموالي يبين بعض الإنزياحات الكيميائية لبروتونات الحلقة B.

الفلافونيد	H-6’ – H-2’	H-5’ – H-3’
Flavones (4’-OH)	7.7-7.9 ppm *d* (*J*=8.5Hz)	6.5-7.1 ppm *d* (*J*=8.5Hz)
Flavonols(4’-OH)	7.9-8.1 ppm *d* (*J*=8.5 Hz)	6.5-7.1 ppm *d* (*J*=8.5Hz)

3’,4’-di-OH	7.2-7.3 ppm *d* (*J*=2.5Hz)	7.3-7.9ppm *d*(*J*=2.5 ;8.5Hz)	-	6.7-7.1 ppm d (*J*=8.5Hz)
3’,4’,5’-tri-OH	6.5-7.5 ppm (*s*)		-	

الجدول -8- الإنزياح الكيميائي لبروتونات الحلقةB

ج– بروتونات الوحدة غير المتجانسة C:

يظهر البروتون H-3 في بنية الفلافون على شكل إشارة أحادية بين (6-7 ppm)[71] حيث لا يمكن تمييزه من بين البروتونات H-6 و H-8 هذا في حالة (5،6،7)، (5،7،8) أو 5,7-OH [72]، وينزاح هذا البروتون نحو 4.2 ppm في حالة dihydroflavonol، في حين يظهر في شكل إشارة متعددة في حالة flavane .

البروتون H-2 في هيكل dihydroflavonol يظهر في شكل ثنائية عند(5.2ppm)، أما في حالة هيكل flavanone فيظهر ثنائي ثنائي بين 5 و5.5 ppm .

نميز أنواعا أخرى من البروتونات تظهر في أطياف الفلافونيدات منها:

- ✓ بروتونات هيدروكسيلية: تظهر بروتونات OH للمواقع 3،5،7 عند: ppm (9.7،12.4 و10.93) على الترتيب.
- ✓ بروتونات ميثوكسيلية: تظهر في شكل إشارات أحادية ما بين (3.8-4.5ppm) [71].
- ✓ بروتونات أوزيدية: والتي تظهر في مجال (3.5-4 ppm) حيث يظهر البروتون الأنوميري "H-1 عند المجالات الأدنى من تلك الخاصة بالشق السكري (4.2-6 ppm)، عدد هذه البروتونات يبين عدد السكريات المتواجدة في الفلافونيد كما تبين من خلال ثابت التزاوج نوع الأنومير α أو β والجدول الموالي يبين بعض قيم الانزياح الكيميائي لبروتونات أنوميرية خاصة بسكريات أحادية.

الفلافونيد	قيم δ لـ "H-1 بـ (ppm)
3-O glucoside flavonol	6.0 - 5.7
7-O glucoside flavonol	5.2 - 4.8
3-O rhamnosyl flavonol	5.3 - 5.1
7-O rhamnosyl flavonol	5.1 - 5.0

الجدول-9-: الإنزياح الكيميائي لبعض البروتونات الأنوميرية.

II-2-4-2 مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون $RMN^{13}C$:

نظرا لإنخفاض طاقة الامتصاص للكربون 13 بالإضافة إلى نسبة وجوده في الطبيعة ٪1.1 فإن كثافة الإمتصاص الناتج عن ^{13}C تكون حولي ٪0.01 بالنسبة لإمتصاص البروتون، لذلك فإن معظم التقديرات الخاصة ب ^{13}C تجري باستخدام FTNMR(Fourier Transformation NMR) للتغلب على الحساسية المنخفضة للكربون، ومن ناحية أخرى فإنه لا يحدث تزاوج بين ذرة الكربون ^{13}C و ^{12}C أخرى لأن احتمال وجود ذرتي كربون 13 متجاورتين ضعيف جدا حوالي 1 لكل 10^4 ذرة ،لكن في نفس الوقت يحدث تزاوج بين ^{13}C و ذرات الهيدروجين المجاورة، وقد يصل مدى التزاوج ليشمل أربع روابط كيميائية، فيكون الطيف المتحصل عليه معقدا للغاية. وللتغلب على هذا التزاوج تستخدم طريقة إزالة التزاوج **Sping decoupling** و ذلك بإشعاع العينة بحزم من أشعة الراديو، تحتوي على جميع الترددات الخاصة بأنوية البروتونات في العينة .

وتحت هذه الظروف فإن طيف الرنين النووي المغناطيسي لـ ^{13}C يظهر في صورة إمتصصات فردية ، ويعبر كل امتصاص عن ذرة كربون واحدة في ظروف إلكترونية معينة.

وباستخدام هذه التقنية يمكن الحصول على صورة واضحة عن الهيكل الكربوني العام للجزيء، كما يمكن الكشف عن بعض المجموعات الكيميائية مثل $C=NR$, OCH_3, $C=O$ وغيرها [69].

يوضح الجدول التالي الإزاحات الكيميائية لذرات الكربون 2، 3، 4 للفلافونات والفلافونولات من خلال تقنية الرنين النووي المغناطيسي $RMN^{13}C$ [73] .

طبيعة الكربون	الإزاحة الكيميائية ppm بالنسبة لـ TMS
Aromatique $C\text{-}CH_3$	7 − 22
Aromatique $O\text{-}CH_3$	59 − 63
3-Methoxyflavone (3-OCH_3)	58 − 59
Sucre CH_2OH, CH-OH, C-glycoside	56 −78

90 −110	5,7-Dihydroxyflavonoide (C_6-C_8)
90 −135	Flavone (C-3)
135 −144	Flavonol (C-3) 3-Methoxyflavone (C-3)
136 −158	Flavonol (C-2) 3-Methoxyflavone (C-2)
155 −168	Flavone (C-2)
172 −186	Flavone (C-4) Flavanol (C-4) 3-Methoxyflavone (C-4)

– الجدول10– يبين أهم الإنزياحات المختلفة لذرات الكربون للفلافونات و الفلافونولات

في أطيافRMN-^{13}C

II–2-4-3 -مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد:

قد تعجز كل من مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون R.M.N ^{1}H وللكربون^{13}C R.M.N على تحديد موضع الإستبدال بالدقة اللازمة فنلجأ إلى مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد، التي تعطي تعالقات بين:

- أنوية متجانسة مثل Cosy ^{1}H-^{1}H والتي تظهر نقاط تعالق بين البروتونات المتزاوجة فيما بينها أي المفصولة برابطتين أو ثلاث J^2,J^3 .
- أنوية غير متجانسة مثل HSQC والتي تعطي نقاط تعالق بين كل بروتون و الكربون الحامل له، ولكن هذه الأخيرة لا تسمح بمعرفة الكربونات الرباعية. فتستعمل تقنية HMBC التي تعطي تعالقات بعيدة المدى تصل إلى الكربونات الرباعية، فيتم تحديدها[72].

II- 2- 5- التحليل البنيوي للفلافونيدات عن طريق مطيافية الكتلة:

تقدم مطيافية الكتلة خدمة واسعة للتعرف على البنى الفلافونيدية ،خاصة كونها لا تتطلب كمية كبيرة من المركب إذ يكفي جزء من ملغ، فمن خلالها يمكن معرفة الوزن الجزيئي وبالتالي معرفة الصيغة المجملة للمركب الذي يبين نوعية المستبدلات ميتوكسيلية كانت أو هيدروكسيلية، كما تمكن قيم الشظايا من معرفة توزع هذه

المستبدلات على الحلقتينA وB .وتعتمد هذه التقنية على عدة طرق أهمها: طريقة القذف الإلكتروني (IE) [74] التي تكون صالحة خاصة مع الأجليكونات.

II-2-5-1 عناصر التحديد البنيوي للفلافونيدات عن طريق مطيافية الكتلة:

يعتمد أساسا لدراسة الفلافونيدات تقنيتين أساسيتين لمطيافية الكتلة هما: تقنية القذف الإلكتروني (I.E) و تقنية القذف السريع بالذرات (F.A.B) و بتفسير الإشارات الجزئية للفلافونيدات الناتجة يمكن الاقتراب من البنية الكلية للفلافونيد وتوزيع المستبدلات على الهيكل الأساسي له.

زيادة على الإشارات المميزة لأنواع الفلافونيدات تظهر قمم مميزة ناتجة عن فقد جزيئات متعادلة أو جذور مثل: CO (-28 u)، CO_2 (-44 u) أو C_2H_2O (-42 u) أو الفقد المتتابع لها مثل: H_2O− CO (-46u)، حيث وجودها ينبئ عن وجود مستبدلات خاصة على الهيكل الفلافونيدي [75].

II-2-5-2 تقنية القذف الإلكتروني (I.E) :

تعتمد هذه التقنية على تطيير المركب في غرفة التأين في درجة حرارة 100-300° م، ليقذف بعدها بسيل من الإلكترونات لتأيينه و بالتالي نحصل على أيونات موجبة حسب المعادلة التالية :

$$\mathbf{M + 1e^- \longrightarrow M^{+\cdot} + 2e^-}$$

و كنتيجة للطاقة التي يكسبها الأيون الجزيئي (M^+) برتبة (70 eV) تحدث له تشظيات من خلالها نحصل على الأيونات المميزة للمركب تحت الدراسة، و تعتبر هذه التقنية صالحة مع *الأجليكون* فقط لأن الإيتيروزيدات تفتقر إلى خاصية التطيير و كذلك لاحتوائها على المستبدلات السكرية التي لا تتحمل الطاقة القوية التي تتطلبها هذه التقنية.

أ- في حالة أجليكون الفلافون:

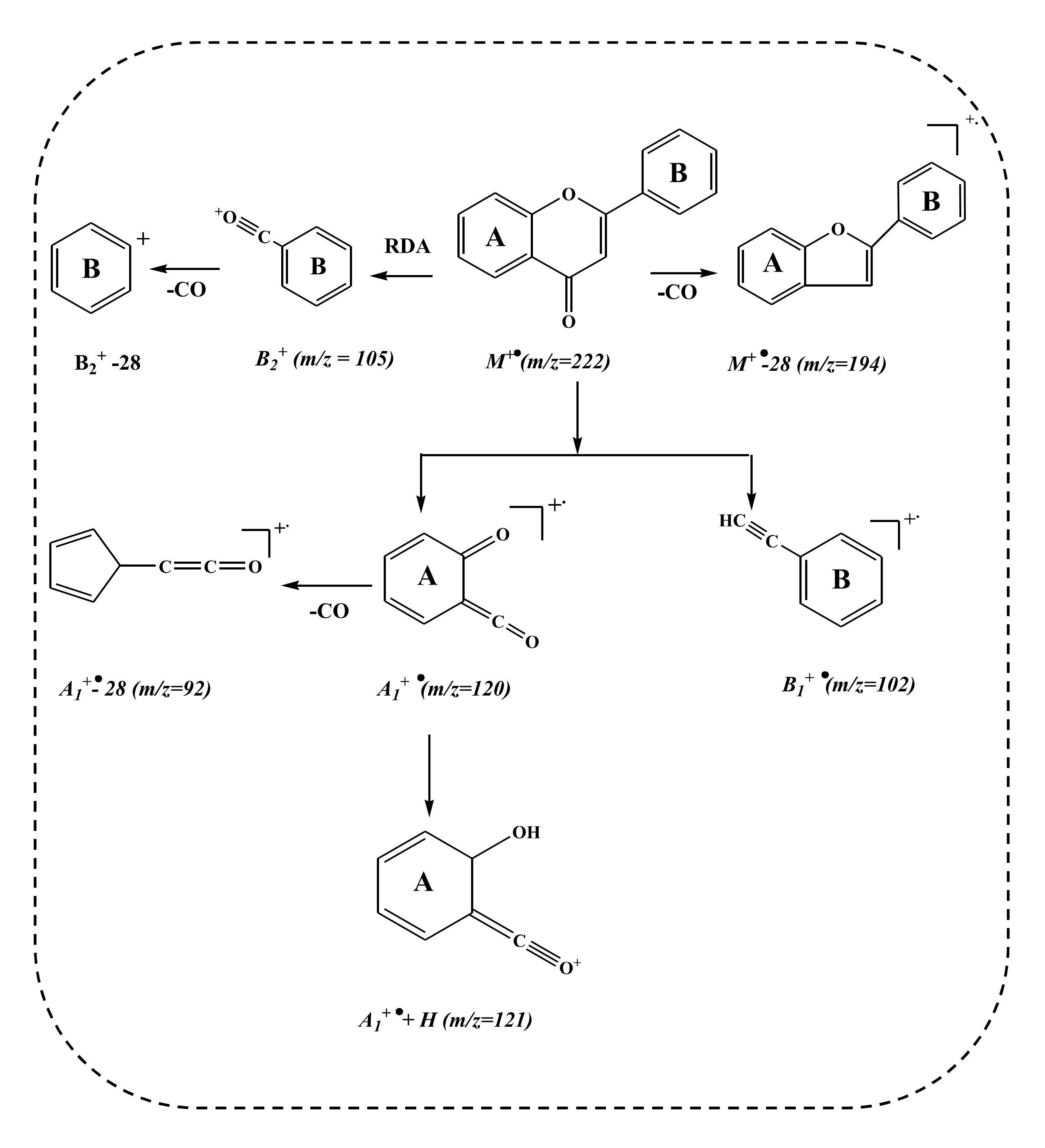
حسب دراسة Audier [74] فإن الانشطار يكون من نوع Retro-Diels-Alder (RDA)

على مستوى الحلقة C ينتج عنه قمة A_1^+ مميزة للحلقة A و قمتين B^+_1، B^+_2 مميزتين للحلقة B.

ويظهر الجدول و الشكل التاليين أهم الإنشطارات لأجليكونات الفلافون و آلياتها على التوالي عن طريق تقنية القذف الإلكتروني (I.E)

الشطر	القمة(m/z)	التعليل
$A^{+\bullet}$ / $[A+H]^{+\bullet}$	120	الحلقة A غير مستبدلة.
	121	الحلقة A أحادية أو متعددة الهيدروكسيل.
	153-152	الحلقة A ثنائية أو متعددة الهيدروكسيل.
	167-166	الحلقة A أحادية الهيدروكسيل ، أحادية الميثوكسيل .
	183-182	الحلقة A ثنائية الهيدروكسيل ، أحادية الميثوكسيل .
$B^{+\bullet}$	102	الحلقة B غير مستبدلة.
	118	الحلقة B أحادية الهيدروكسيل.
	134	الحلقة B ثنائية الهيدروكسيل.
	148	الحلقة B أحادية الهيدروكسيل ، أحادية الميثوكسيل .
	150	الحلقة B ثلاثية الهيدروكسيل.
	162	الحلقة B ثنائية الميثوكسيل.
	(15−B)87	الحلقة B تكون O-méthoxylée.
	القمة A أكبر من B	مشتق غير مؤكسج على B.
	القمة B أكبر من A	الحلقة B لها ميثوكسيل.

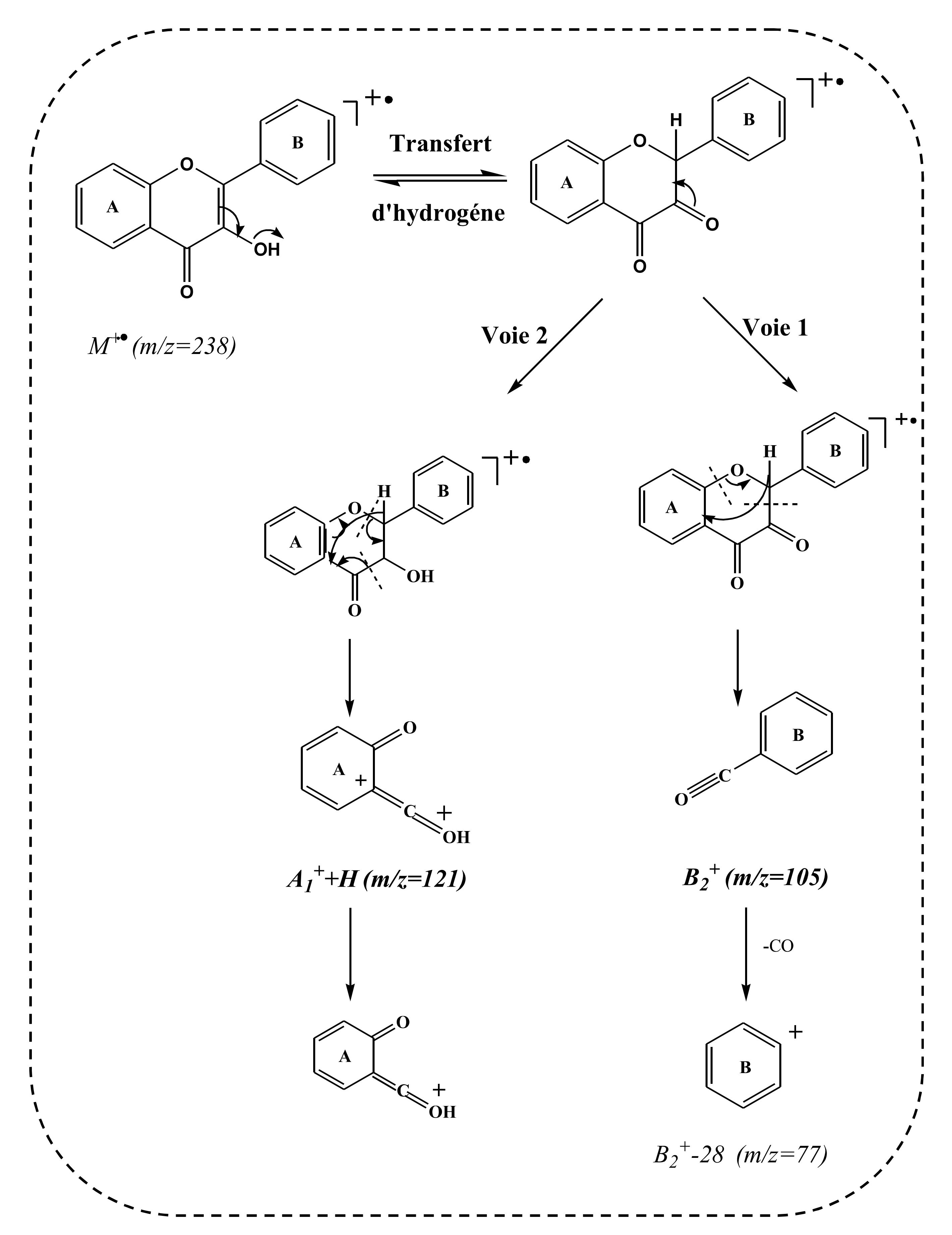
<u>الجدول-11- : أهم انشطارات أجليكون الفلافون</u>



الشكل-6-: آلية إنشطار أجليكونات الفلافون

ب– في حالة أجليكون الفلافونول :ـ

يحدث انشطار Diels-Alder و يتبعه ظهور أيونين مهمين هما : B^+_2 (C) ، $[A_1+H]^{+\cdot}$ (D) حيث الأول يعبر عن الحلقة B و الثاني عن A بالإضافة إلى القمة الأساسية و هي للأيون الجزيئي $M^{+\cdot}$.



الشكل -7- أهم الإنشطارات الملاحظة على الفلافونول.

II-2-5-3 تقنية الـ FAB:

تعد من التقنيات الحديثة ،تستعمل لتأيين المركبات الطيارة و الجزيئات التي تتكسر بالحرارة دون تسخين كالجليكوزيدات (*O*-glycosides) و التي نتحصل منها على طيف به معلومات تخص الجزء السكري إضافة إلى الأيونات المميزة للفلافونيدات .

و تعتمد هذه التقنية على وجود منبع تفريغ (كاثود) و الذي يؤين ذرات الأرغون فنحصل على (Ar^{+}):

$$Ar \longrightarrow Ar^{+} + 1é$$

و التي تدخل إلى غرفة الصدم المحتوية هي الأخرى على غاز الأرغون و تحت ضغط معين يحدث إنتقال الشحنة بين Ar و Ar^{+} كما يلي:

$$Ar^{+} + Ar \longrightarrow \overrightarrow{Ar} + Ar^{+}$$

تبقى الذرات الناتجة (Ar) محافظة على طاقتها و عند خروجها من غرفة الصدم نحصل على الخليط (Ar^{+} :Ar) ،نعزل منه Ar^{+} بلوحي مكثفة و بذلك نحصل على سيل من ذرات Ar تدخل إلى غرفة التأين لتصدم ذرات المركب المدروس الموضوعة على لوح معدني فنحصل على أيونات المركب التي يتم قلعها ، تسريعها و تحليلها بعد ذلك [76].

II-2-5-4- تقنية الإلكتروسبراي électrospray :

تعتبر هذه التقنية أحدث من (F.A.B) و تختلف عنها في الطريقة العملية، حيث تسمح بدراسة الجزيئات ذات الأوزان الجزيئية الكبيرة كالبروتينات و الجزيئات الصغيرة سهلة التكسير مثل المضادات الحيوية و المبيدات [77].

أما بالنسبة للفلافونيدات فتستعمل تقنية الإلكتروسبراي (ES) لدراسة المركبات سهلة التكسير مثل : O-glycosides و يتميز طيف الكتلة المحصل عليه بوجود قمُة الأيون الجزيئي $[MH]^{+}$ و قمم موافقة للأيونات شبه الجزيئية من الشكل $[M+Li]^{+}$، $[M+Na]^{+}$ ... [78]

II-2-6- الإماهة الحمضية :

بالإضافة إلى التقنيات السابقة يمكن الاستعانة بالتميّه الحمضي للتعرف على عدد ونوع السكريات الموجودة في المركبات الجليكوزيدية إذ تعمل هذه التقنية على تحطيم الرابطة (كربون . أكسجين) الجامعة بين السكر والأجليكون. والشكل (8) يبيّن الإماهة الحمضية للفلافونيدات الجليكوزيدية في حالة O– جليكوزيل و C– جليكوزيل [71].

Gly – O → (H^+) → HO + Glycoside

Flavone -O-glycoside → Flavone

GlY–O–GlY → (H^+) → Gly + Glycoside

Flavone - C - glycoside

الشكل –8– : الإماهة الحمضية للفلافونيدات الجليكوزيدية

تتم عملية التميه الحمضي في أنبوب اختبار بأخذ كمية قليلة من الجليكوزيد مذاب في حوالي (1 مل) من الميثانول ويضاف له (1 مل) من حمض كلور الماء HCl (4N) ثم يسخن في حمام مائي 100 م° لمدة 15 إلى 120 دقيقة.

بعد تبريد الأنبوب يعمد إلى استخلاص من نوع سائل/سائل بدءًا بإيثر الإيثيل (éthylic ether) بعد الرج الجيد يترك الأنبوب للراحة لتفصل بعدها الطبقة العضوية عن المائية، تكرر العملية مرة أخرى مع خلات الإيثيل (éthyl acétate) ثم البيوتانول العادي (n-butanol).

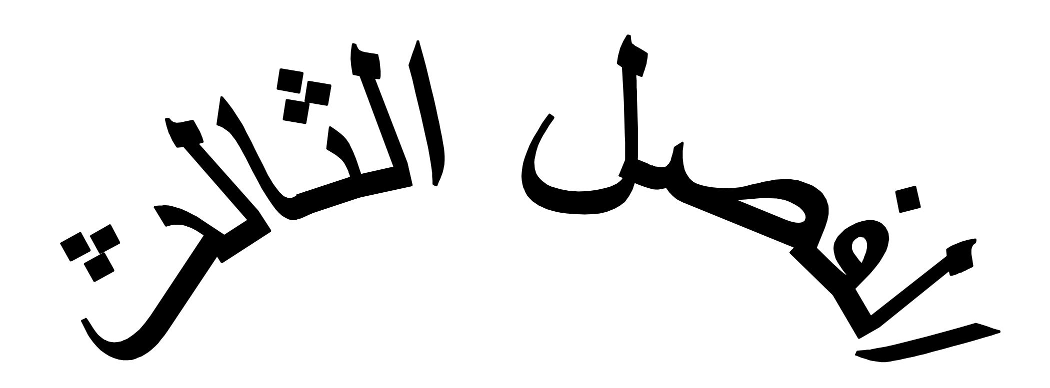
تركز الطبقة العضوية الحاوية على الأجليكون الذي يمكن التعرف عليه بتسجيل طيف (UV) وكذا بإجراء كروماتوغرافي (CCM) مع شواهد أجليكونية، أما الجزء السكري من الجليكوزيد فيبقى مذابًا في الطبقة المائية التي يتم تجفيفها ثم يعاد غسلها بالماء لتجفف من جديد تكرر هذه العملية عدة مرات للتخلّص من HCl وأخيرا تغسل بالميثانول للتخلص من أثار الطبقة العضوية ثم يعاد إذابتها في الماء لتكون جاهزة للتحليل، وللتعرف على نوع السكر المنفصل يعمد إلى تحضير ألواح كروماتوغرافية من Gel de silice $60F_{254}$ ترش

بمحلول NaH_2PO_4 (0,2M) تترك لتجف في الهواء ثم توضع في فرن تحت درجة حرارة 100 م° لمدة ساعة كاملة.

بعدها توضع نقطة من الطبقة المائية الحاوية على الجزء السكري بالموازاة مع بعض الشواهد السكرية المعروفة، يغمس اللوح الكروماتوغرافي في المملص : أستون : ماء (90 : 10)، بعد هجرة البقع السكرية يستخرج اللوح الكروماتوغرافي ليجف في الهواء لمدة ساعة بعدها يرش بكاشف مالونات الأنيلين ويسخن عند 100° لمدة 5 دقائق حيث تبدأ بقع السكريات بالظهور بلون داكن وتأخذ اللون الأصفر تحت (UV). والجدول (11) يبيّن قيم *Rf* لبعض السكريات الشائعة [58].

السكريات الشواهد	***Rf***
α(L) rhamnose	0,88
L(+) arabinose	0,66
D(+)-xylose	0,79
b-D(+) glucose	0,53
D(+) galactose	0,33

الجدول-11- : قيم *Rf* لبعض السكريات الشائعة



الدراسة الكيميائية لنبتة

sisnevra ahtneM

III-1- الدراسة الكيميائية النباتية لنبتة *Mentha Arvensis*:

III- 1-1- مقدمة :

تعتبر العائلة الشفوية (**Lamiaceae**) من النباتات التي تستعمل لعدة أغراض في حياتنا اليومية, وميزتها الزيوت الطيارة التي تفرزها الغدد المنتشرة على كافة الأجزاء النباتية,والتي تستعمل في عدة مجالات صناعية من بينها صناعة العطور.

ومن بين هذه الأنواع الخزامة : *Lavande* ؛ الجعدة *: Phlomis* ؛ النعناع:*Menthe*

؛الإكليل: *Romarin*.

ويعود أصل تسميتها إلى الكلمة اللاتينية **Labium**, والتي تعني الشفتين. معظم هذه النباتات أعشاب حولية أو معمرة,أو شجيرات سيقانها قائمة.أما أوراقها فتكون متقابلة متعامدة بسيطة بلا أذنيات, نوارتها غير محدودة,وقد تكون النوارة لولبية ,أوبسيطة ذات شعبتين أوعقربية وهي عند كل عقدة,تكون ما يشبه السوار. ويكون شكل النوارة إما سنبلي أو عنقودي أو هامي. زهراتها خنثى وحيدة التناظر سفلية,ويتألف الكأس من خمسة سبلات ملتحمة ومستديمة وهو أنبوبي الشكل أو شفوي أو مسنن.يتألف التويج من خمسة بتلات ملتحمة على شكل شفتين,أما الطلع فيتألف من أربعة أسدية , ويتكون المتاع من كربلتان ملتحمتان وقلم واحد ينتهي بميسمين . أما القرص الغدي فيقع في أسفل المبيض وأحيانا يكون بشكل غدة كبيرة على الجانب الأمامي , يوجد في المبيض حجرتان لكل واحدة منهما بويضتان . أما الثمرة فتتكون من أربع ثميرات تقع بداخل الكأس, وتكون البذرة أندوسبيرمية وكثيرا مايمتصها الجنين .

تشمل هذه الفصيلة حوالي 200 جنس و 6000 نوع تنتشر في جميع أنحاء العالم خصوصا حوض البحر الأبيض المتوسط . تحتوي هذه العائلة على جنس *MENTHA*

حيث يشمل هذا الجنس على 69 نوع منتشرة في حوض البحر الأبيض وجنوب القارة الأسيوية و أمريكا اللاتينية .

يتميز جنس Mentha بغناه بالمركبات الطبيعية التالية : التربينات terpen الفلافونيدات flavonoides كزانتونات xentons التانين tanins الستيرولات steroides و الاحماض الفينولية Acide phénoliqueكما ان هذا الجنس معروف بزيوته الاساسية حيث يحتوي على % 70 مانتول menthol اللدي يستخدم في صناعة العطور،السجائرو في الصناعة الصيدلانية

III-1-2-بعض المركبات المفصولة من الجنس *Mentha* :

تم عزل العديد من الفلافونيدات مختلفة البنية الكيميائية من الجنس *Mentha* منها الأجليكونية و الإيتيروزيدية من خلال مجموعة من الأعمال أنجزت ،يمكن ان تلخص بعضها في الجدول التالي:

المرجع	التسمية	المستبدلات			صيغة الفلافونيد
		R_3	R_2	R_1	
80	eriocitrine	OH	OH	rut	
80	narirutine	OH	H	rut	
80	hesperidine	OMe	OH	rut	
81	naringenine	OH	H	OH	
80	luteolin-7-O-rutinoside	OH	OH	rut	
80	Isorhoifoline	OH	H	rut	
80	diosmine	OMe	OH	rut	
82	Tricetin 7-*O*-methoxy-3-*O*-*β*-*D*-glucosyl-5'-*O*-*α*-*L*-rhamnosyl	rha-O	glu-O	OMe	
82	tricetin *3'-O-β-D* glycosyl -*5'-O-α-L*-rhamnosyl	rha-O	glu-O	OH	
82	Tricetin 3'-di-*O*-rhamnosyl	H	dirha	OH	
83	5,6-dihydroxy-7,8,3',4'-tetramethoxyflavone	OMe	OMe	OH	
83	5-hydroxy-6,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone	OMe	OMe	OMe	

الجدول (1): الفلافونيدات المفصولة من الجنس *Mentha*.

المرجع	التسمية	المستبدلات			صيغة الفلافونيد
		R_3	R_2	R_1	
83	5,4'-di hydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	OH	OMe	OH	
83	5,6-di hydroxy-7,8,4'-trimethoxyflavone	OMe	OMe	OH	
83	5-hydroxy-6,7,4'-trimethoxyflavone	OMe	H	OMe	
83	5-hydroxy-6,7,8,4'-tetramethoxyflavone	OMe	OMe	OMe	
83	5,6,4'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone	OH	OMe	OH	
83	apiginine	OH	OH	OH	
83	acacetine	OMe	OH	OH	
84	acacetin-7-*O*-rutinosyl	OMe	-O rut	OH	
83	sorbifoline	H	OMe	OH	
83	luteoline	OH	OH	H	

الجدول (2) الفلافونيدات المفصولة من الجنس *Mentha* (تابع)

المرجع	التسمية	المستبدلات			صيغة الفلافونيد
		R3	R2	R1	
83	**thymonine**	**OMe**	**OMe**	**OH**	
83	**sideritoflavone**	**OH**	**OMe**	**OMe**	
83	**5,6,4'-trihydroxy-7,3'-dimethoxyflavone**	**OMe**	**H**	**OH**	
83	**cirsilinol**	**OMe**	**H**	**OMe**	
83	**5, 4'-dihydroxy-6,7,8, 3'-tetramethoxyflavone**	**OMe**	**OMe**	**OMe**	
83	**5, 6-dihydroxy-7,3', 4'-trimethoxyflavone**	**OMe**	**H**	**OH**	
83	**5, hydroxy-6,7,3', 4'-tetramethoxyflavone**	**OMe**	**H**	**OMe**	
83	**ladaneine**	**H**	**H**	**OH**	
83	**Gardenine D**	**OH**	**OMe**	**OMe**	
85	**Keampférol -3-*O*-glucosyl (1→2) rhamnosyde-7-*O*-glycoside**		**H**	**H**	
85	**Keamférol -3-O-(6''-p-coumaroylglucosyl) (1→2) rhamnosyde-7-O-glycoside**	**H**	*p*-coumaroyl		
85	**Keampférol -3-*O-(4''-p-*coumaroylglucosyl) (1→2) rhamnosyde-7-*O*-glycoside**	*p*-coumaroyl		**H**	

الجدول (3) الفلافونيدات المفصولة من الجنس *Mentha* (تابع)

المرجع	التسمية	المستبدلات			صيغة الفلافونيد
		R_3	R_2	R_1	
86	**kaempferol-3-*O*-glucosyl**	**H**	**OH**	**O-glu**	
86	**Luteolin-7,3'-diglucosyle**	**O-glu**	**O-glu**	**H**	
86	**Luteolin-3-*O*-glucosyle**	**OH**	**OH**	**O-glu**	
86	**Luteolin-7-*O*-glucopyranosy**	**OH**	**O-glu**	**H**	
83	**Lutiolin-7-*O*-rutinosyl**	**OH**	**rut-O**	**H**	
83	**Apigenin-7- *O*-rutinosyl**	**H**	**rut-O**	**H**	
83	**Apigenin-7-β-O-glycopyranosyl**	**H**	**glu-O**	**H**	
83	**jaceidine**				
83	**6-hydroxykaempferol-3،5،7-trimethoxy**				
83	**artemetine**				

الجدول (4) الفلافونيدات المفصولة من الجنس ***Mentha*** (تابع)

III- 1-3- التصنيف النباتي للنبتة:



الصورة-1- *Mentha arvensis* صورة فوتوغرافية لنبتة

Royaume	Plantes	المملكة
Sous royaume	Tracheobiontes	تحت المملكة
Embranchement	Spermatophytes	الفرع
Division	Magnoliophytes	القسم
Classe	Magnoliopsides	الصنف
Sous classe	Asteridae	تحت الصنف
Ordre	Lamiales	الرتبة
Famille	Lamiaceae	العائلة
Genre	*Mentha*	الجنس
Espèce	*Mentha arvensis*	النوع

الجدول-5-التصنيف النظامي لنبات *M.arvensis*.

III-1-4- وصف النبتة:

اشتق اسم arvensis من الاسم اللاتيني arvum واللذي يعني الحقل ويمكن وصف النبتة كالتالي :

هي نبتة يتراوح طولها ما بين 10سم الى 60سم ذات أوراق بيضاوية الشكل ذات رائحة عطرة متقابلة تتوضع على الجذع رباعي الشكل لونه أخضر و في بعض الأحيان بنفسجي قادرة على بث شعيرات ماصة في حالة ملامستها للأرض، أزهارها ذات ألوان بنفسجية أو زهرية تتجمع في كؤوس في نقطة التقاء الورقة مع الساق نزهر ما بين شهري جويلية و أكتوبر.

lll-1-5 خصائصها:-

تشتهر نبتة *Mentha arvensis* كباقي انواع النعناع بزيوتها الأساسية و اللتي تمتاز بفعالية بيولوجية عالية جيث يتكون زيتها الأساسي من -7- المركبات الملخصة في الجدول

	المركب	نسب وفرتها
Monoterpènes	béta-pinène	1.09%
	alpha-pinène	0.97%
	myrcène	0.39%
	sabinène	0.39%
	limonène	3.87%
Monoterpénols	: menthol	42.43%
	néo-menthol	4.74%
	linalol	0.19%
Monoterpénones	menthone	21.76%
	iso-menthone	9.25%
	pipéritone	0.94%
	pulégone	0.96%
Esters terpéniques	acétate de menthyle	4.38%
Sesquiterpènes	béta-caryophyllène	0.84%

جدول 6- يبين مكونات الزيوت الاساسية لنبتة *Mentha arvensis*

III - 1- 6 -الدور العلاجي:

لنبات *Mentha arvensis* خصائص علاجية هامة مرتبطة أساسا بزيوتهاالأساسية اللتي تحتوي على المانتول الذي يعطيها قيمة علاجية كبيرة لمكافحة عدة أمراض منها:

- صداع الرأس
- يسكن الام الأسنان
- يسكن الألام العصبية
- مضاد للجراثيم
- مضاد للعدوى
- يستخدم لعلاج الاكزيما والقوباء
- يعالج القيء في حالة الحمل وعسر الهضم
- توفرشعوركبيرا بالنضارة
- يحفز نشاط القلب
- يعالج الجيوب الأنفية
- يعالج البرد و التعب
- يخفف من مشاكل الجهاز الهضمي
- يعالج المغص الكلوي والمغص الكبدي

III - 2 المادة النباتية:



جمعت النبتة من ضواحي ولاية جيجل بالشرق الجزائري في ماي2009 وخلال تجميع النبتة تم تخليصها من كل الشوائب العالقة بها, بعدها تمت عملية التجفيف في الظل بعيدا عن الرطوبة فتحصلنا على 437 غ من المادة النباتية

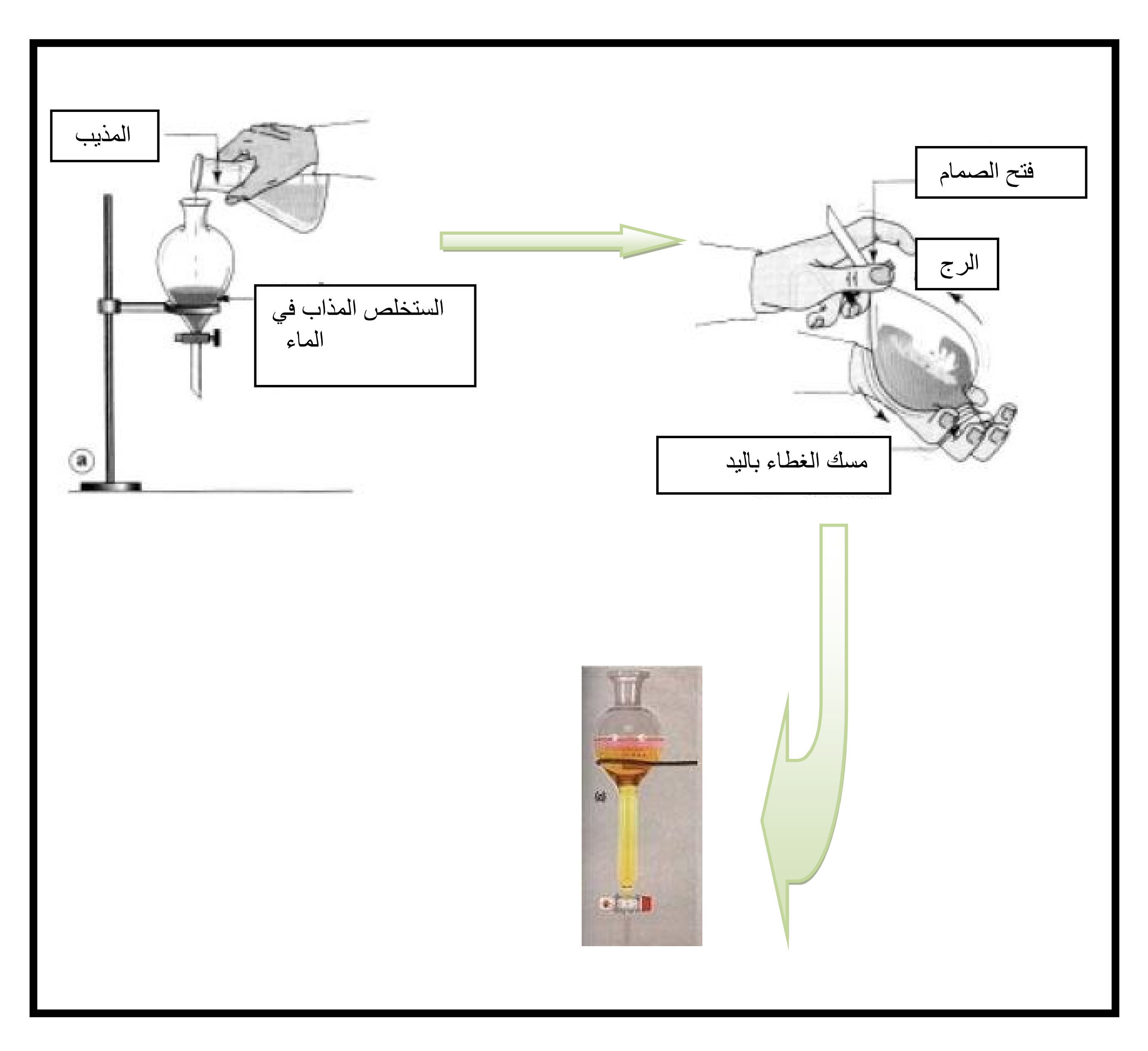
III- 2-1- استخلاص النبتة :

_وضعنا المادة النباتية في أواني مجهزة لهذه العملية و غمرناها بمحلول به : ماء / ميثانول (3/7) و تركت لمدة 24 ساعة، ليرشح بعدها و يركز الراشح أما المحلول المسترجع بعد التركيز فيُجدد بالكمية الكافية لغمر المادة النباتية و هذا لإعادة العملية حتى يضعف تركيز لون الراشح أي استخلاص أكبر كمية ممكنة و لذلك فقد كررنا العملية 4 مرات على ان يستبدل المحلول كل 36ساعة.

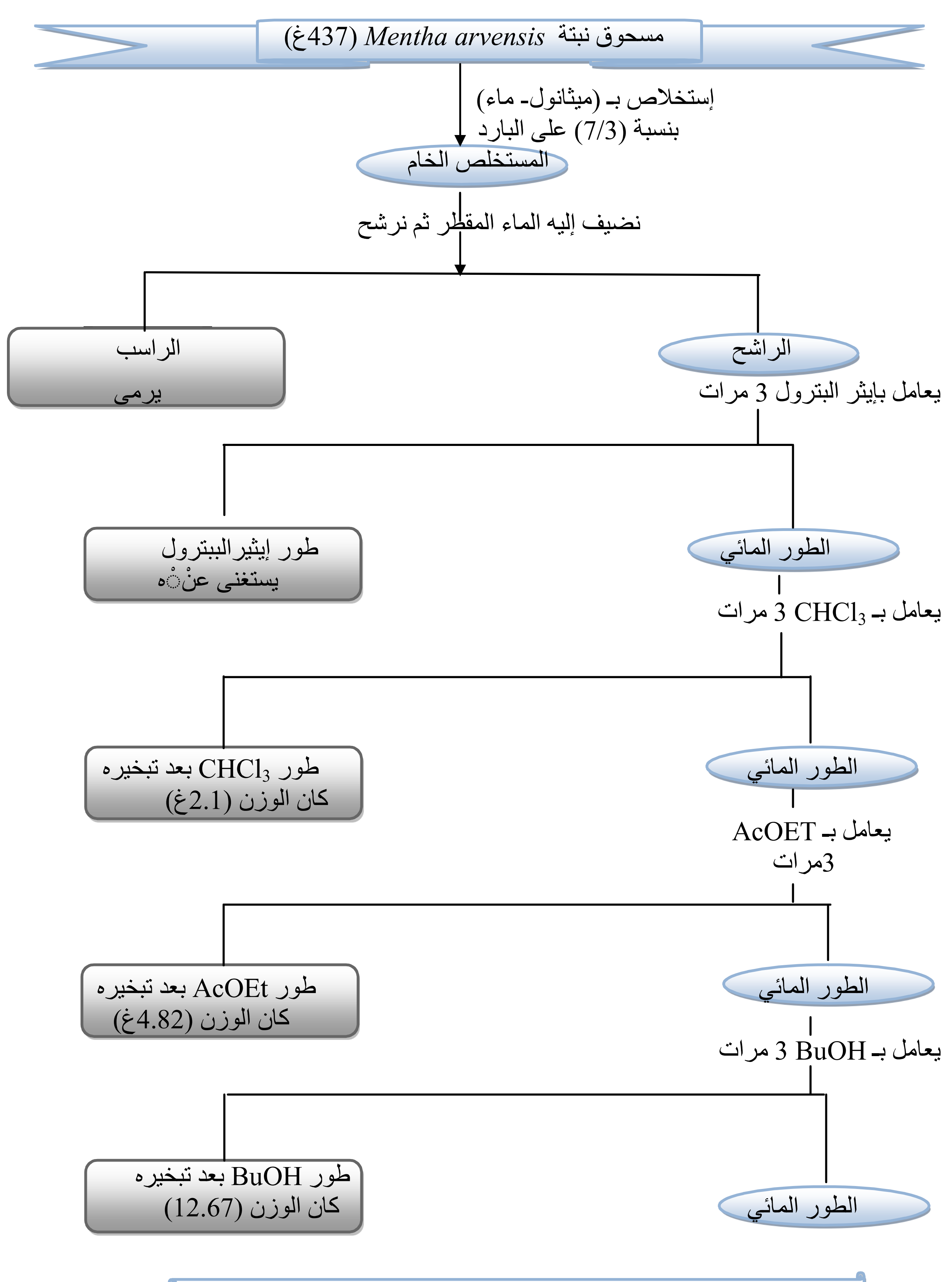
أذبنا المستخلص الخام المركز المتحصل عليه في حوالي 250 مل من الماء المقطر الدافئ (400-500 مل ماء مقطر لكل 1 كغ من المادة النباتية الجافة) ثم تركناه ليلة كاملة للراحة و أخذنا فقط الجزء السائل و تخلصنا من الراسب الذي بقي في أسفل الإناء لنبدأ بعدها بفصل الأطوار حيث أضفنا أولا الكلوروفورم بنسبة1/3 من حجم المستخلص المذاب في الماء المقطر و ننتبه أن لا نرّج جيدا مخافة تشكل مستحلب وتركناه مدة زمنية كافية حتى انفصل الطوران حيث يكون الطور الكلوروفورمي هو الأثقل أي الأسفل و هو الذي قمنا بتركيزه و كررنا العملية حتى غاب اللون المميز لهذا الطور، و في الأخير نقلنا المستخلص المركز بإذابته في القليل من الكلوروفورم و وضعناه في قارورة صغيرة معلومة الوزن و هذا لمعرفة وزن هذا الطور. بنفس الطريقة عاملنا الطور المائي بخلات الإيثيل ثم بالبوتانول النظامي و اللذان يكون فيهما الطور العضوي هو الأخف أي إلى الأعلى قمنا بتكرير العملية ثلاث مرات لكل طور و في كل مرة ننقل المستخلص المركز بقليل من الميثانول ثم نزن فحصلنا بذلك على:

- ✓ وزن طور الكلوروفورم يساوي 2.1 غ.
- ✓ وزن طور خلات الإيثيل يساوي 4.82 غ.
- ✓ وزن طور البوتـانول العادي يساوي 12.67 غ.

و قد قمنا بتلخيص العمليات السابقة في المخطط المبين في الشكل -2



الشكل -1-.عملية الاستخلاص من النوع سائل/ سائل .



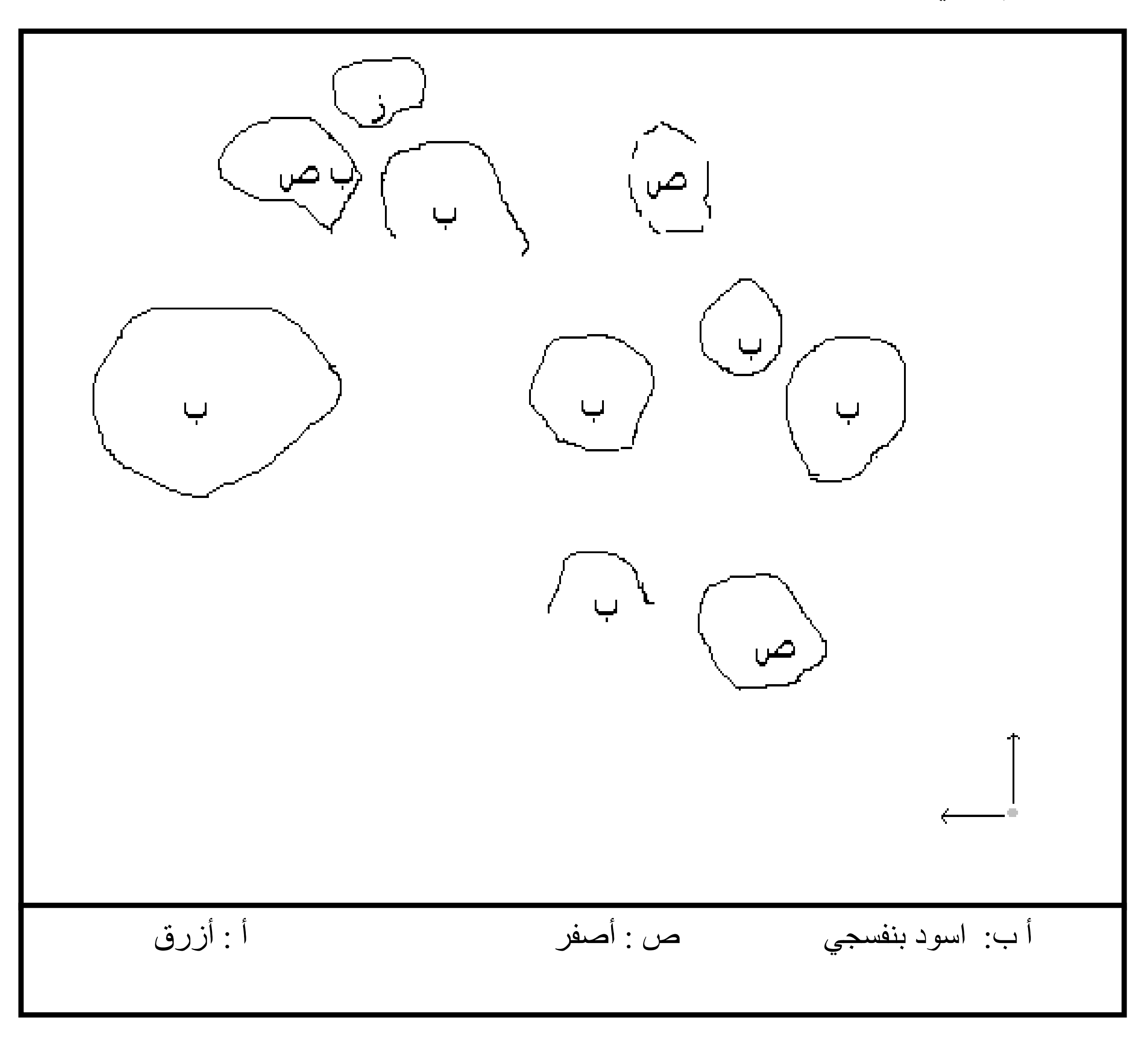
شكل - 2- خطوات عملية إستخلاص المادة النباتية النبتة *Mentha arvensis*

III- 2-2- طريقة الفصل والتنقية:

بما أن الهدف الأساسي من بحثنا هو فصل المركبات الفلافونيدية، قمنا باختيار المستخلص الأسيتاتي. وأجرينا له فحص كروماتوغرافي على الورق حيث في البعد الأول D_1 كان المملص هو المذيب العضوي

B.A.W (n-**B**uOH, **A**cétic acid, **W**ater) 4/1/5 :

في البعد الثاني المملص كانD_2 المملص المذيب المائي acide acétique 30٪ فتحصلنا على الكروماتوغرام التالي



الشكل -3-كروماتوغرام ثنائي البعد على ورق واطمان لطور خلات الايثل *M.arvensis*

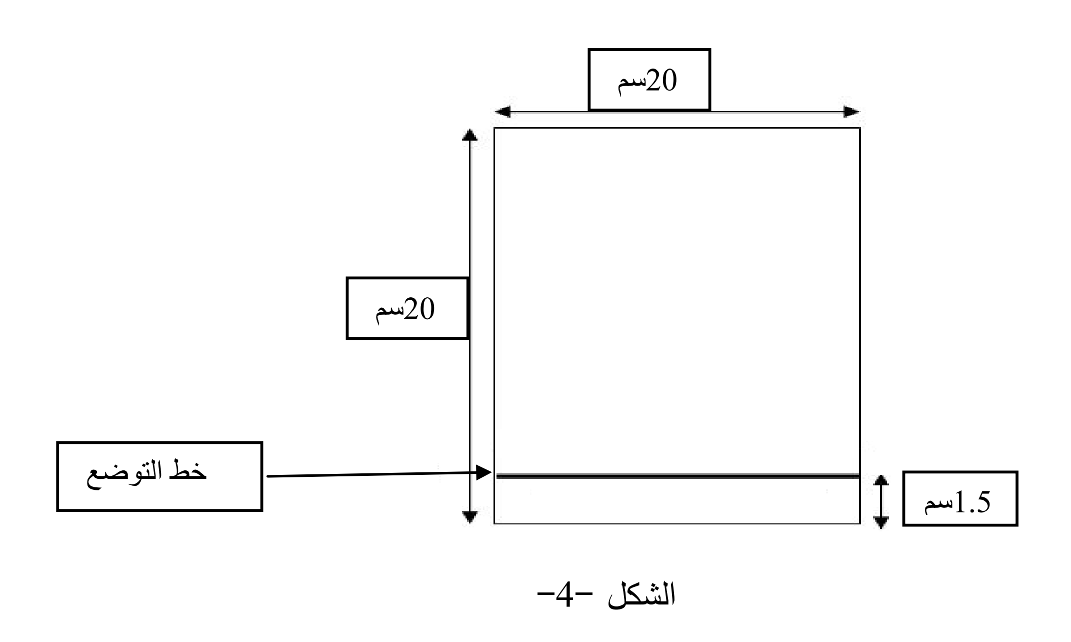
نظرا لنتائج الفحص الكروماتوغرافي قررنا استخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (CCM) وذالك للاستفادة من مزايا هته الطريقة

III -3- الطريقة العملية النتائج الكيميائية :

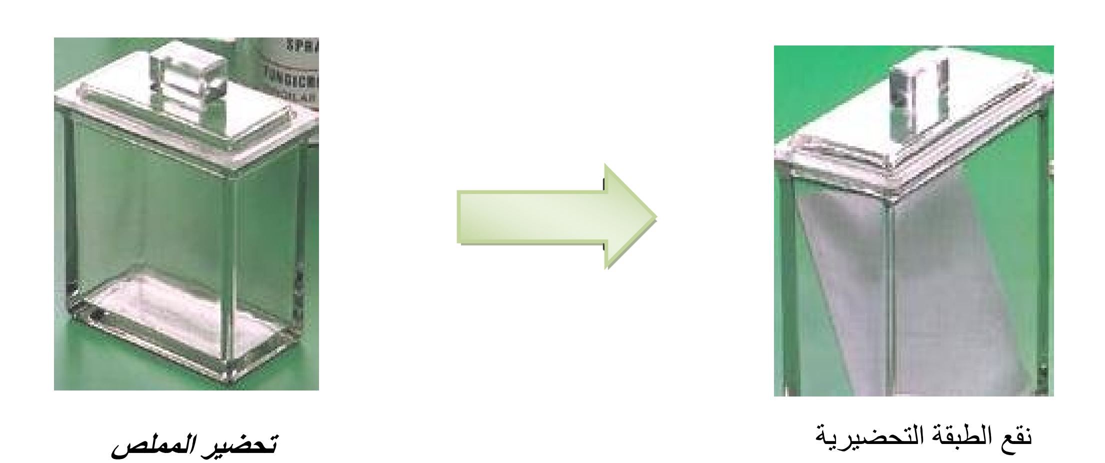
في خطوة اولية قمنا بتحضير 50 شريحة تحضيرية على ثلاث مراحل حيث قمنا بتحضير الدعامة بالرّج الجيّد للسيليكاجال مع الماء المقطر ثمّ وضعناه بواسطة Etaleur على صفائح من زجاج ذات ابعاد (20×20سم) بسمك منتظم و نتركها تجف بعدها نضعها في درجة حرارة 100°م على الأقل لمدة ساعة. بعد أن تبرد نضع عليها العينة بطريقة عرضية على بعد 1.5 سم من الحافة وننقعها عموديا في حوض به المملص المناسب كما هو موضح في الصورة–2– و بانتشار هذا الأخير اللذي دام ثلاث ساعات تفصل المركبات على شكل أحزمة حددناها بمصباح UV .نقوم بكشط كل منها على حدى و نغسلها بالميثانول جيّدا في أقماع زجاجية ، تركز بعدها الرشاحة حيث كانت الدعامة عبارة عن السيليكاجال HF_{254}.

استهلكنا من خلال هذه العملية 2غ من المستخلص الاسيتاتي بينما كان المملص النظام التالي:

كلوروفورم /الاسيتون/ميثانول بنسب 0.5/4.5/5 على الترتيب



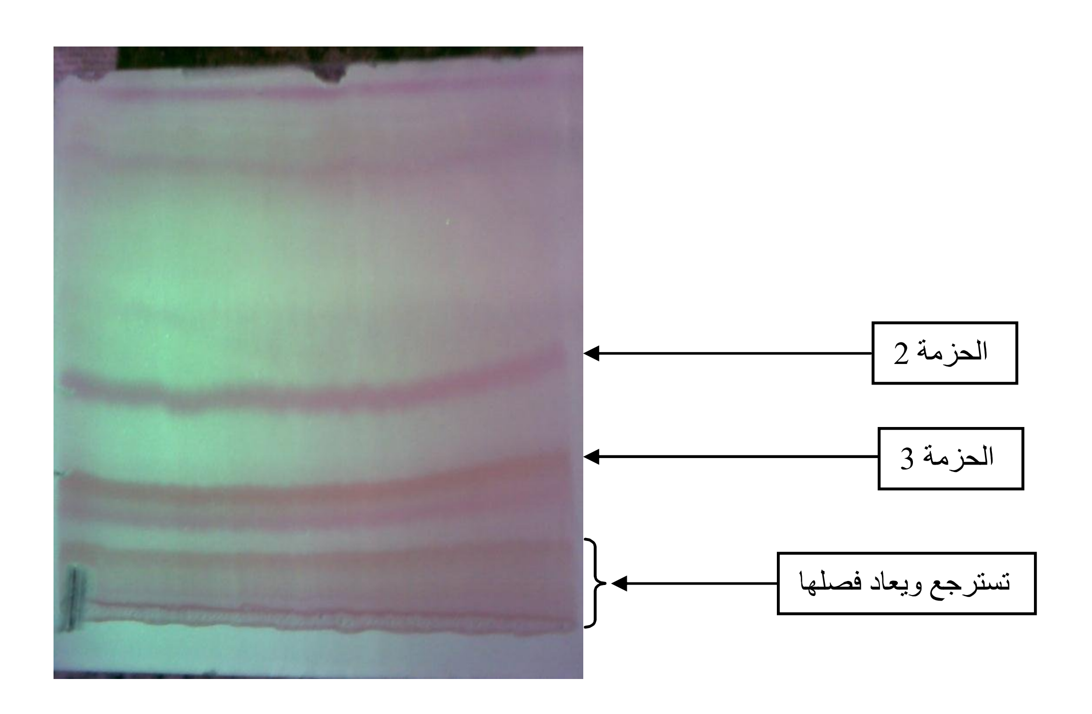
الشكل –4–



الصورة-2-

فتحصلنا على حزم تظهر بواسطة مصباح UV كما هو موضح في الصورة-3-استطعنا فصل المركبين B_2 ، B_3 حيث تمت تنقية المركب B_2 بواسطة عمود السيفاداكس Sephadex LH20.

أما المركب B_3 تمت تنقيته باستعمال كروماتوغرافيا العمود مع السيليكاجال كدعامة (flashe colonne) بينما المملص كان الكلوروفورم مع أغنائه تدريجيا بالأسيتون .

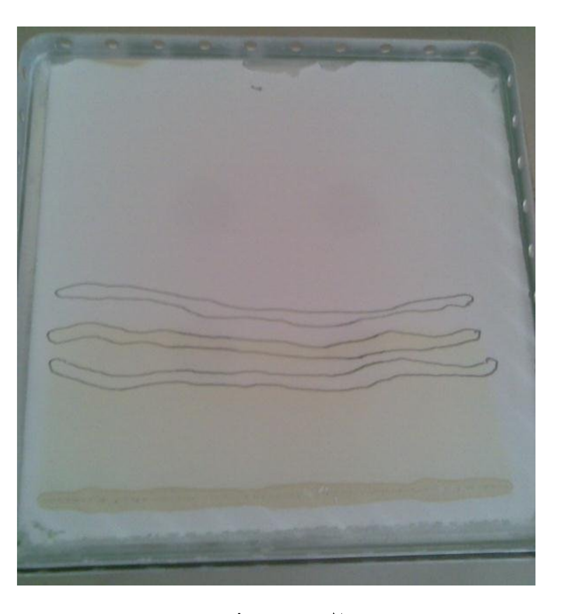


الصورة-3-

عند فصل المركبين B_2، B_3 لاحظنا ان المستخلص لم يهاجر كله من مستوى التوضع الابتدائي و لهذا ارتأينا أن نسترجعه من الجال ونفصله بنفس الطريقة ولكن هذه المرة غيرنا المملص فاستعملنا النظام التالي:

هكسان/خلات الايثيل/الاسيتون/ميثانول بنسب 0,5/4,5/5/3على الترتيب .

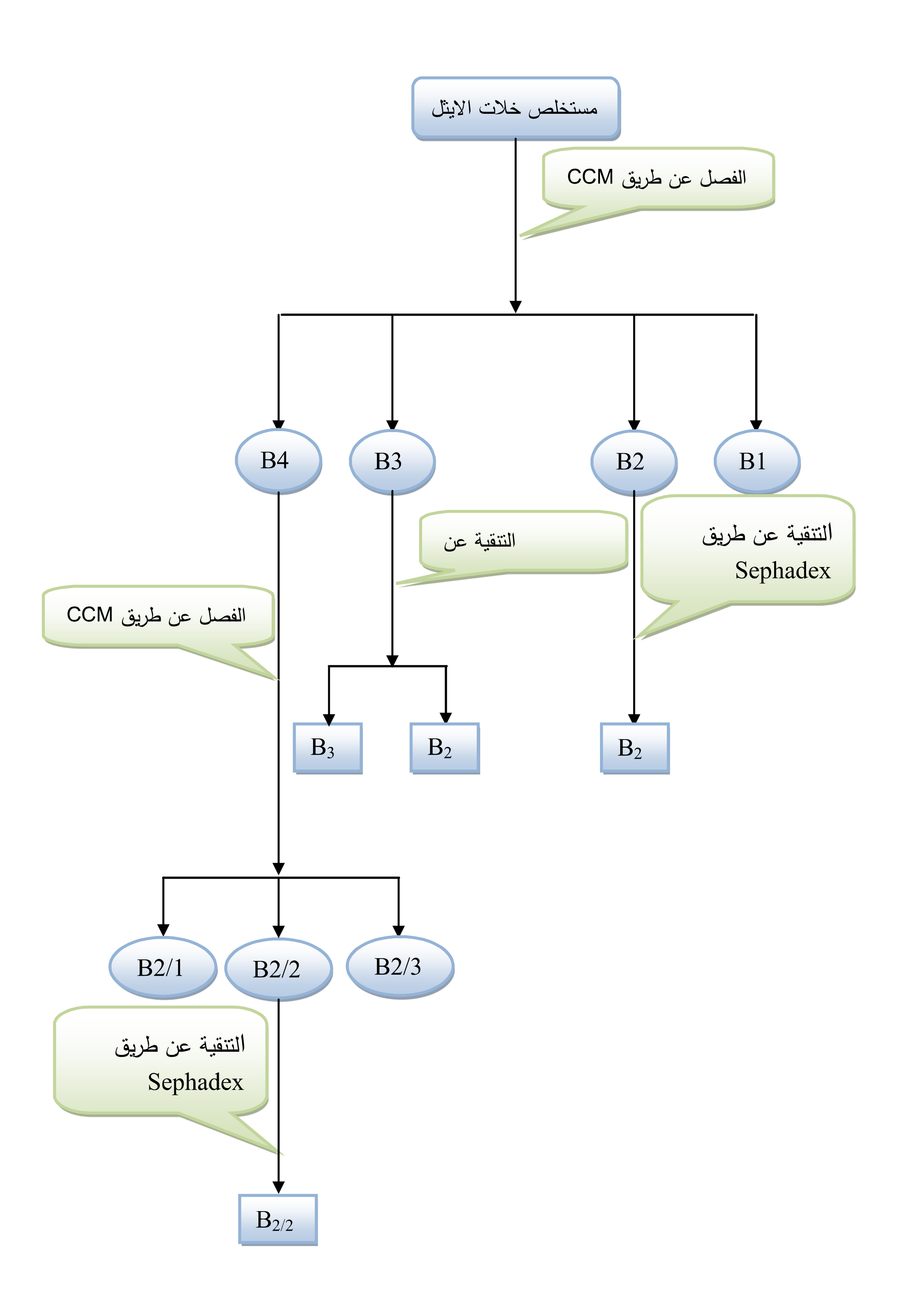
بعد ان قمنا بعملية التمليص مرتين تحصلنا على ثلاث حزم احداها تظهر تحت مصباح UV في الموجة 365 ولا تظهرتحت الموجة254 اما الحزمتين الاخريتين تظهران تحت الموجتين



الصورة-4-

- ✓ الحزمة الأولى: هي $B_{2/1}$ لم يتم دراستها لعدم توفر الكمية الكافية لتحليلها
- ✓ أما الثانية وهي $B_{2/2}$ تم تحديد بنيته وذلك بعد تنقيته عن طريق عمود السيفاداكس Sephadex LH20.
- ✓ بينما الحزمة الثالثة هي $B_{2/3}$ فكانت تحوي خليط معقد من المركبات لم يتم فصلها.

و لقد قمنا بتلخيص عملية الفصل والتنقية ضمن المخطط التالي:



شكل - 5- مخطط الفصل و التنقية

ومنه خلال عملنا هذا تم فصل ثلاث مركبات فلافونيدية B_2، B_3، $B_{2/2}$ ولكن تم تحديد بنية مركبين فقط و هما:

- المركب B_2
- المركب $B_{2/2}$

الفصل الرابع

مناقشـــة النتائـــج الكيميائيـــة

IV . التعيين البنيوي للمركبين

IV-.1التحليل البنيوي للمركب B_2:

اعتمدنا في التعرف على البنى الكيميائية للمركبات النقية المتحصل عليها على:

- السلوك الكروماتوغرافي بالاستعانة بالشواهد و لتعيين الجزء السكري في حالة الجليكوزيدات نستخدم الحلمهة الحمضية .

- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية . المرئية. UV
- الرنين النووي المغناطيسي.(^{1}H)RMN

IV. 1--1 سلوكه الكروماتوغرافي:

توضح قيم معامل الاحتباس في الجدول (1).

الجملة	SI	SII
$R_f \times 100$	25	16
اللون الإستشعاعي	اسود بنفسجي	

الجدول (1) : السلوك الكروماتوغرافي

SI : Toluène/MEC/MeOH (4 / 3 / 3)

SII : H_2O/MeOH/MEC/Acétyl acétone (13 / 3 / 3 / 1)

IV- .1- 2 – مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

مطيافية الأشعة فوق البنفسجية الخاصة بالمركب B_2 موضحة بالجدول– 2–

الكواشف	العصابة I (nm)	العصابة II (nm)	قمم(nm)
MeOH	354	266	
NaOH	396	266	323
$AlCl_3$	351	269	396–303
$AlCl_3$+HCl	349	275	396–303
NaOAc	382	275	304
NaOAc+H_3BO_3	360	269	364–303
NaOH بعد 5 دقائق : مستقر			

الجدول 2: مطيافية الأشعة فوق البنفسجية–المرئية

اللون الأسود تحت الأشعة فوق البنفسجية وطول العصابة (I) في الميثانول عندλ_1= 354 nm

يدلان على أن المركب عبارة عن فلافونول مع 3-OR (أي عدم وجود OH حر في الموضع 3).

قيم ثابت الاحتباس (R_f) تدل على أن المركب هو جليكوزيدي احادي السكر.

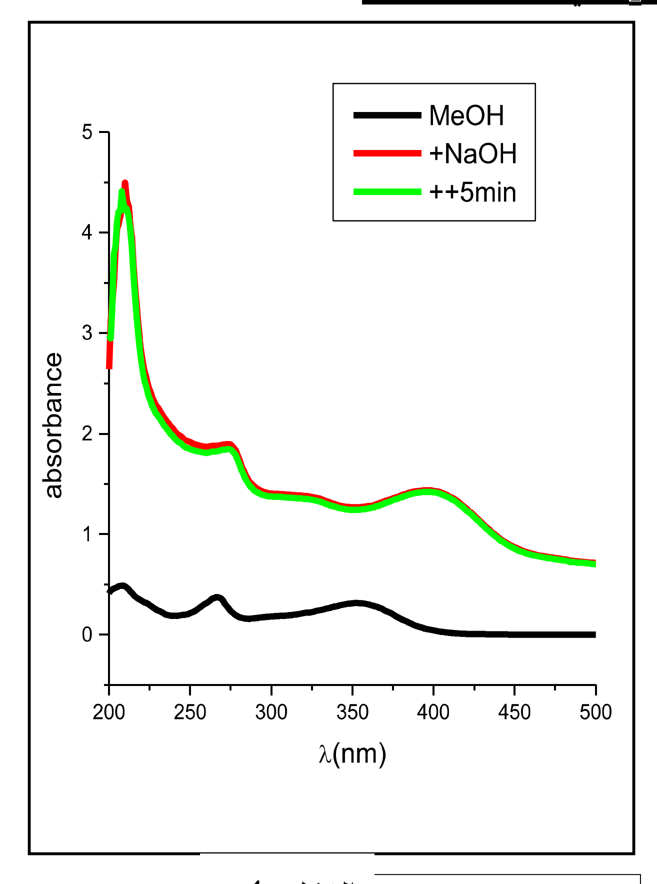
بمقارنة الطيف المسجل في هيدروكسيد الصوديوم مع الطيف المسجل في الميثانول نجد أن إزاحة باثوكرومية للحزمة (I) بـ +42 نم مع زيادة في الشدة دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 4́ ، مع ظهور حزمة جديدة عند 323نم دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 7 مؤكدا بالانزياح الباثوكرومي للعصابة II +9 نم في NaOAC بالنسبة للمركب الميثانولي. ، و استقرار طيف NaOH يؤكد غياب OH حر في الموضع 3 .

الإزاحة الباثوكرومية بـ: +45 نم المترتبة عن مقارنة طيف MeOH ب $AlCl_3$+HCl دليل على وجود OH حر في الموضع 5.

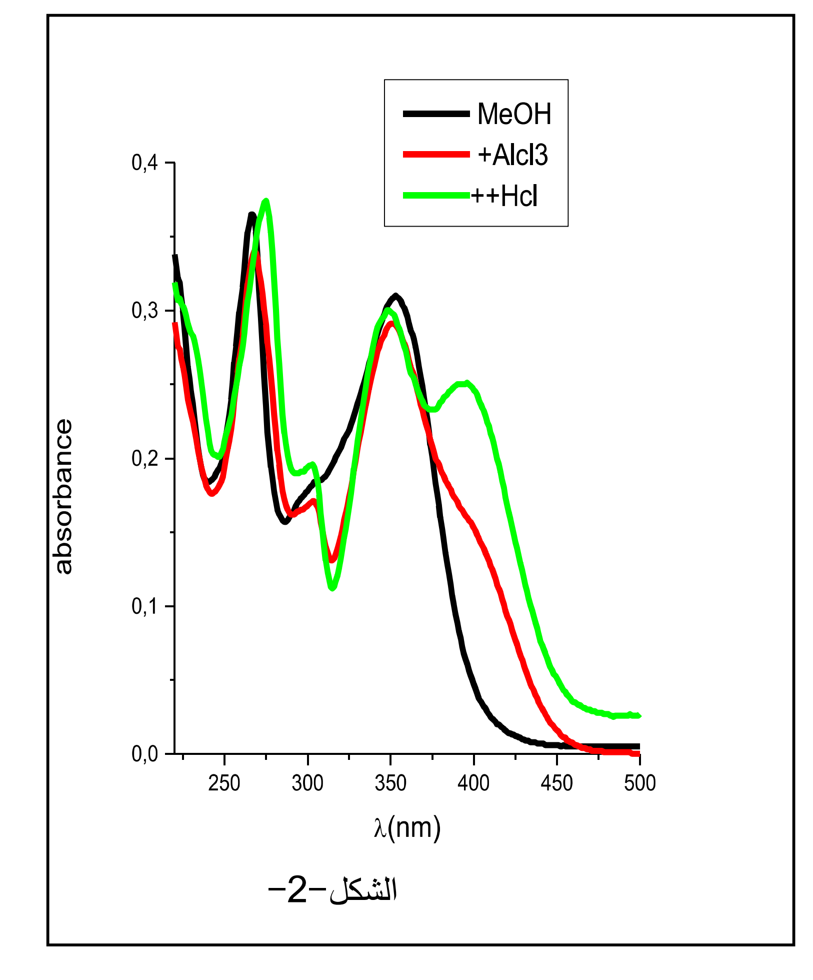
الإزاحة الهيبسوكرومية للعصابة (I) بـ –2نم المترتبة عن مقارنة طيف $AlCl_3$ ب $AlCl_3$+HCl دليل على عدم وجود نظام أرتو ثنائي هيدروكسيل في الحلقة B .

الطيف المسجل في NaOAc+H_3BO_3 يشير إلى عدم وجود أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة A أو الحلقة B و هي نفس الملاحظات المأخوذة من طيف المسجل في$AlCl_3$+HCl

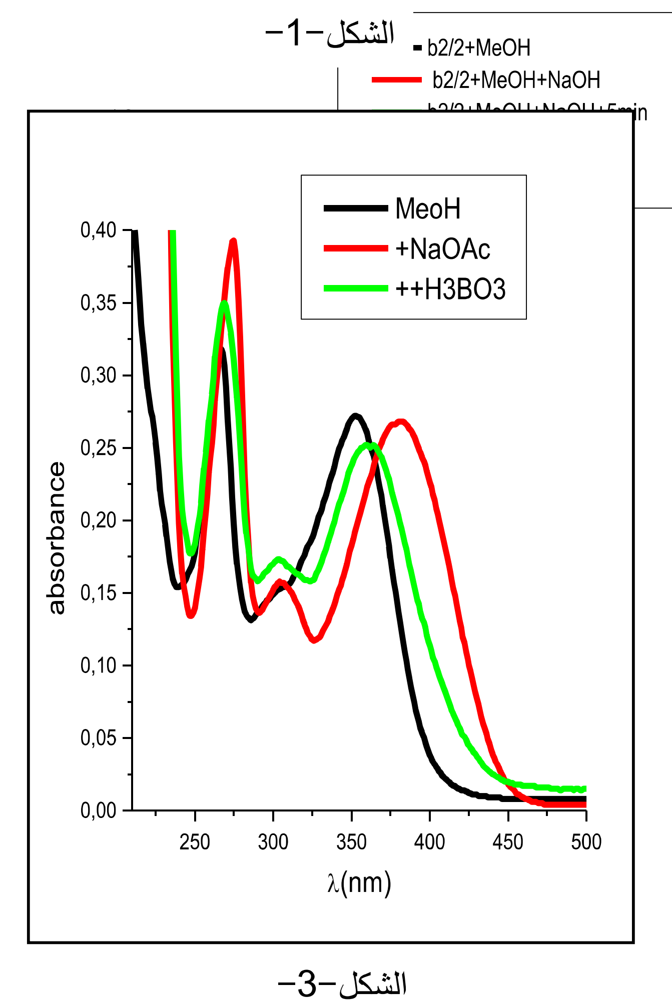
سلسلة أطياف UV للمركبB_2 في مختلف الكواشف



الشكل-1-



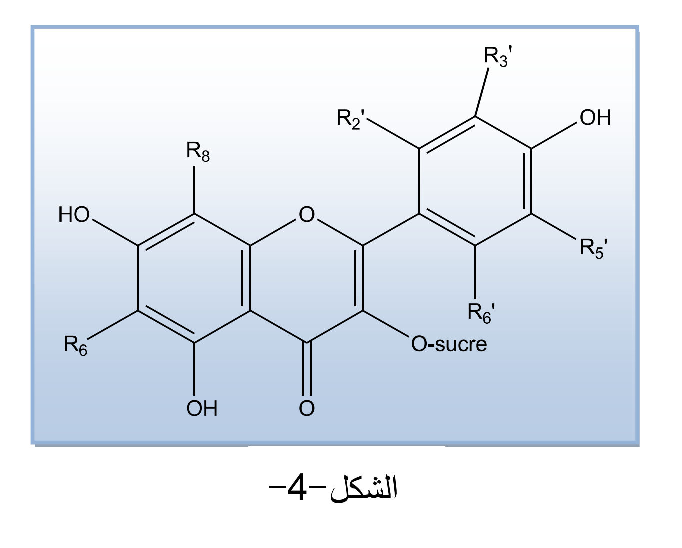
الشكل-2-



الشكل-3-

✓ من هذه المعطيات يمكننا أن نعطي بنية

أولية للمركب B_2 وهي كالتالي :



الشكل-4-

IV.1−3 -- 3− مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون RMN-^{1}H:

تلخص نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسيRMN-^{1}H (CD_3OD, 250MHz). في الجدول التالي:

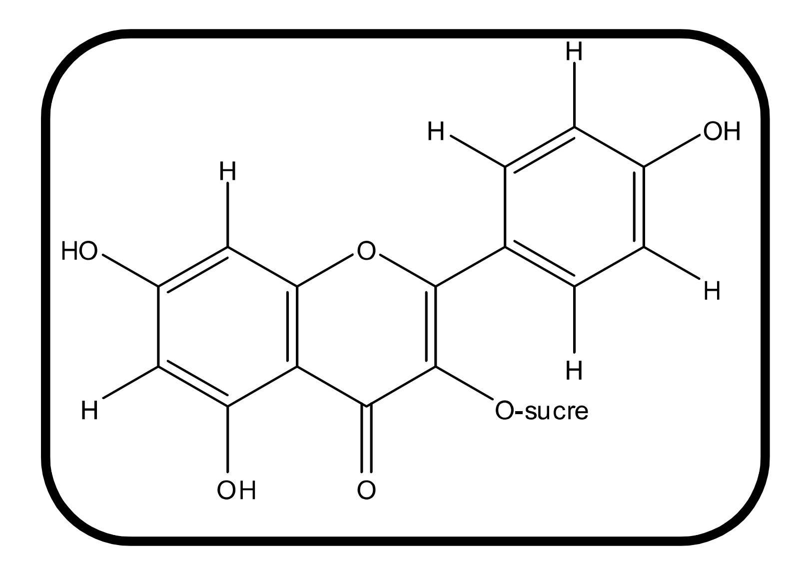
الازاحةالكيميائية δ(ppm)	التكامل	التعددية	ثابت التزاوج J (Hz)	البروتون الموافق
6,18	H1	*d*	2,1	H_6
6,33	H1	*d*	2,1	H_8
6,90	H2	*d*	9,0	$H_{3'}.H_{5'}$
8,30	H2	*d*	8,9	$H_{2'}.H_{6'}$
5,20	H1	*d*	6,9	H''_1
3,40-5,20		*m*		بروتونات السكر

الجدول (3) : مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب B_2 (RMN-^{1}H)

يبين طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون RMN-^{1}H (للطيف−1−) الذي دونت نتائجه في الجدول − 3 −

- وجود إشارتين ثنائيتين d(J = 2,0Hz) بتكامل 1H لكل منهما عند δ = 6,18ppm و δ = 6,33 ppm و هي إزاحة خاصة ببروتونات الحلقة A لذا يمكن نسبتهما إلى كل من و H_6 و H_8على الترتيب و ذلك تأكيدا لمعطيات مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV).
- وجود إشارة ثنائية بتكامل 2H عند δ = 6,90ppm بثابت تزاوج d(J = 2,0Hz) يمكن نسبتها إلى البروتونين $H_{3'}$ و $H_{5'}$
- كما يبين نفس الطيف وجود إشارة ثنائية d(J = 8.9Hz) بتكامل 2H عند δ = 8.30ppm يمكن نسبتها إلى البروتونين $H_{2'}$و$H_{6'}$
- و نلاحظ وجود إشارة ثنائية (d(J = 6,9Hz بتكامل 1H عندδ = 5,20ppm و هي إزاحة خاصة بالبروتون الانوميري للسكر $H_{1''}$.

من كل المعطيات الطيفية السابقة(RMN^1H, UV) يمكن ان نخلص إلى أن المركب B_2 هو عبارة عن:



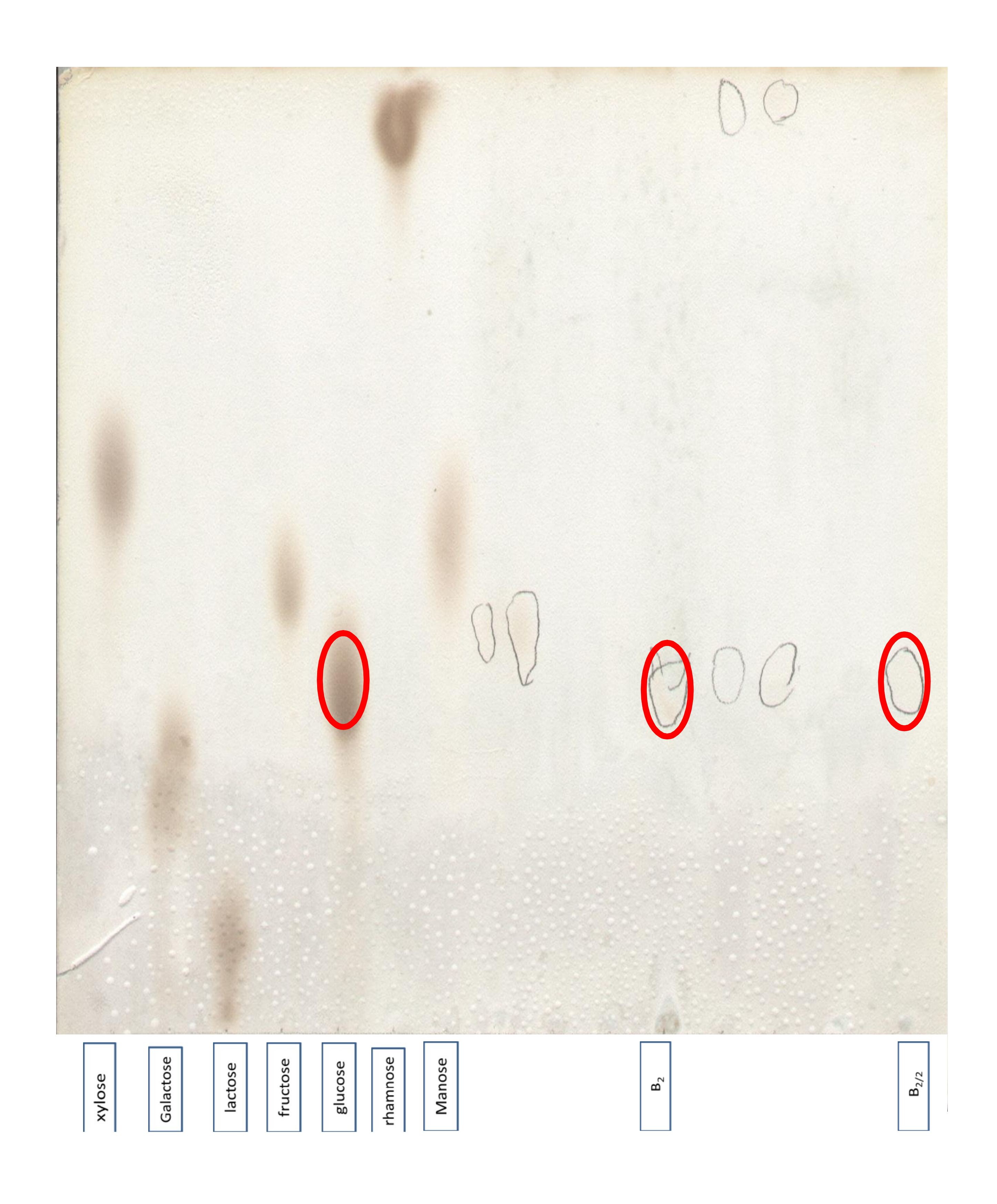
الشكل-5-

ولمعرفة نوع السكر قمنا بعملية الحلمهة الحمضية و قارنا الشق السكري لـ:

B_2 بعدة شواهد سكرية فوجدنا أنه يماثل شاهد *D*-glucose كما هو موضح في الصورة -1- ونظرا لثابت تزاوج البروتون الأنوميري($J = 6,98$Hz) يمكن ان نقول ان السكر هو *β-D*-glucose

وتأكيدا لموقع ارتباط السكر قمنا بتسجيل طيف UV للشق الأجليكوني الذي أصبح لونه الأستشعاعي اصفر فتأكدنا أن الموقع 3 أصبح به OH حر.

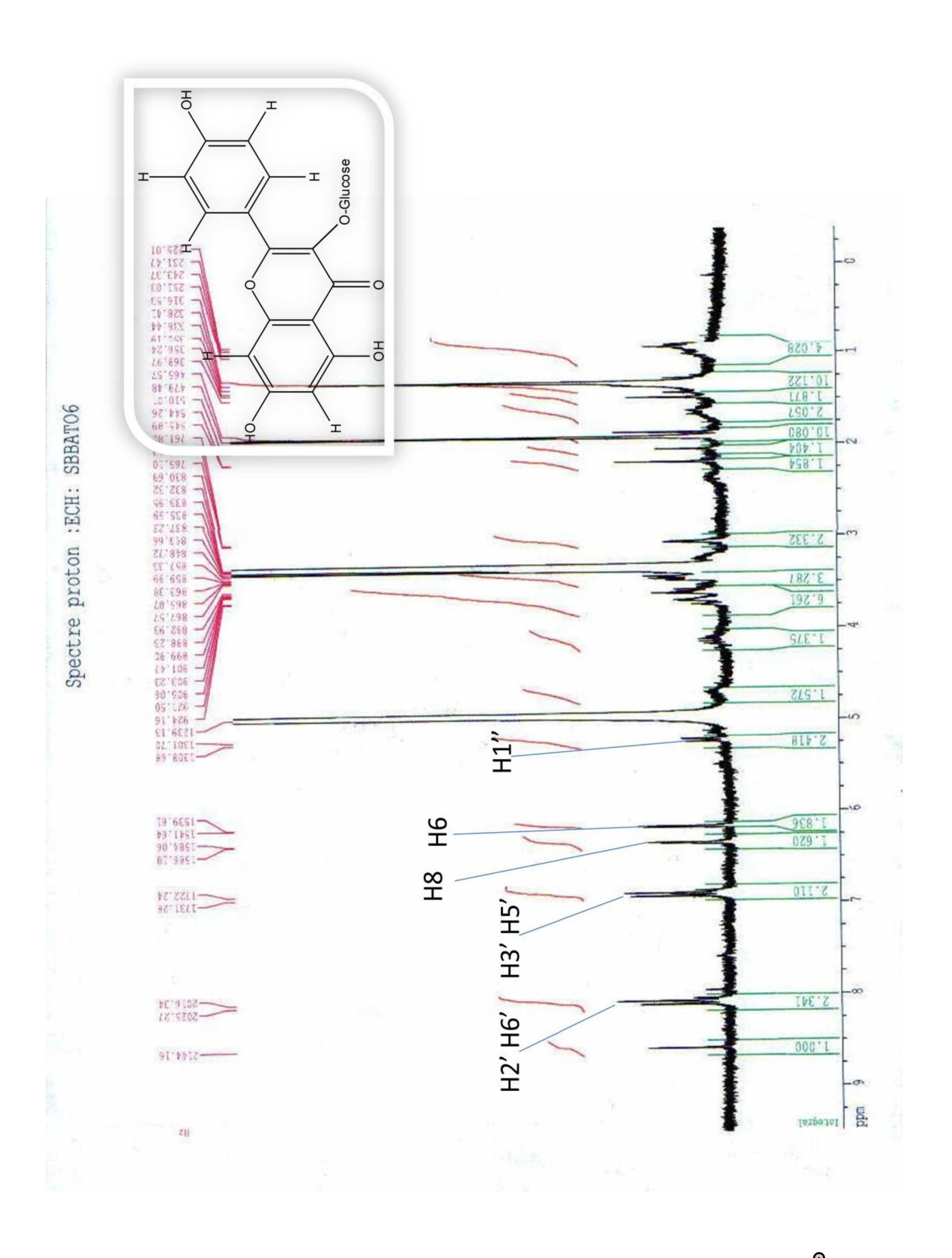
الصورة-1- كروماتوغرام السكريات المفصولة من المركبات مقارنة مع شواهد سكرية معروفة



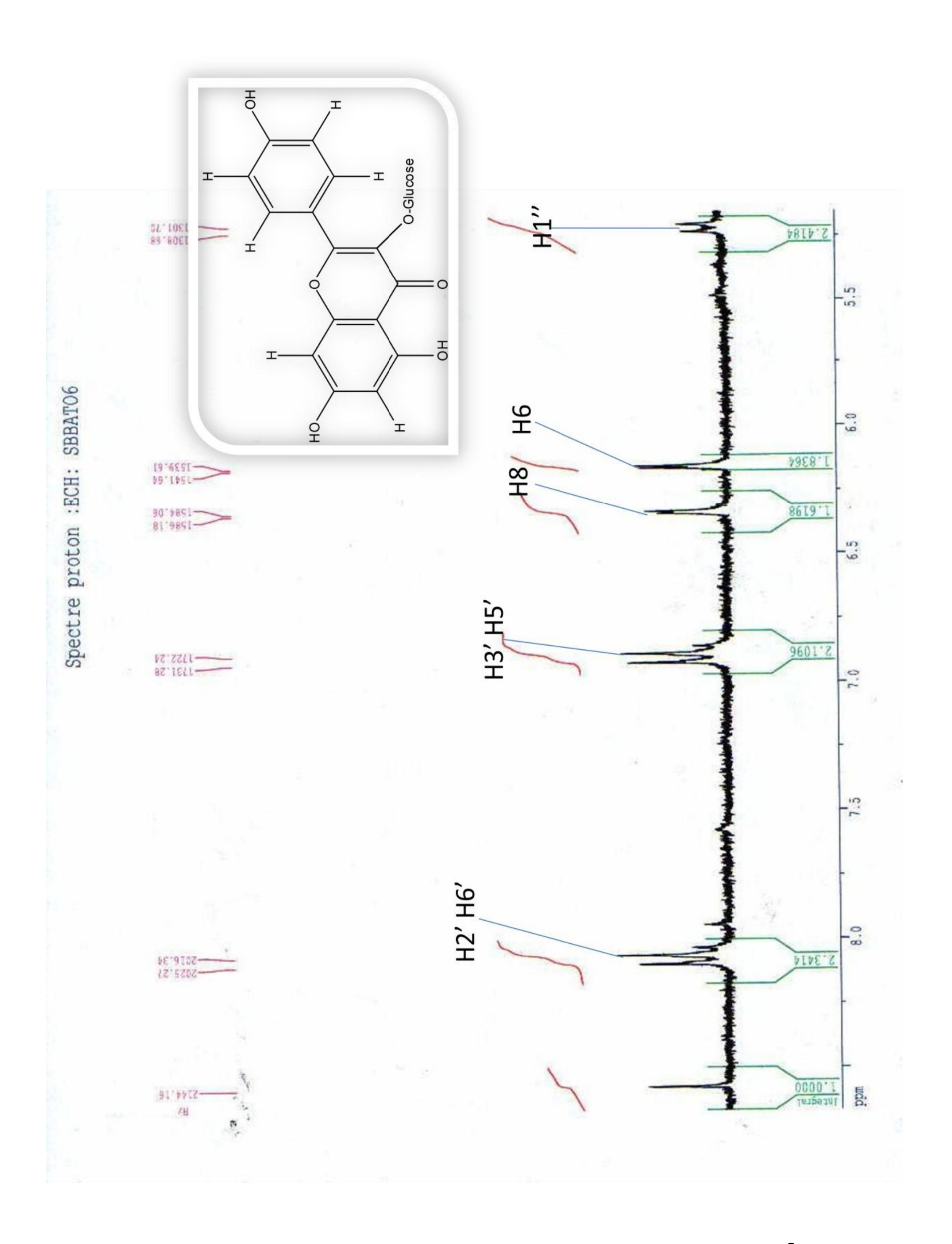
إذن البنية النهائية للمركب B_2 هي

الشكل–6

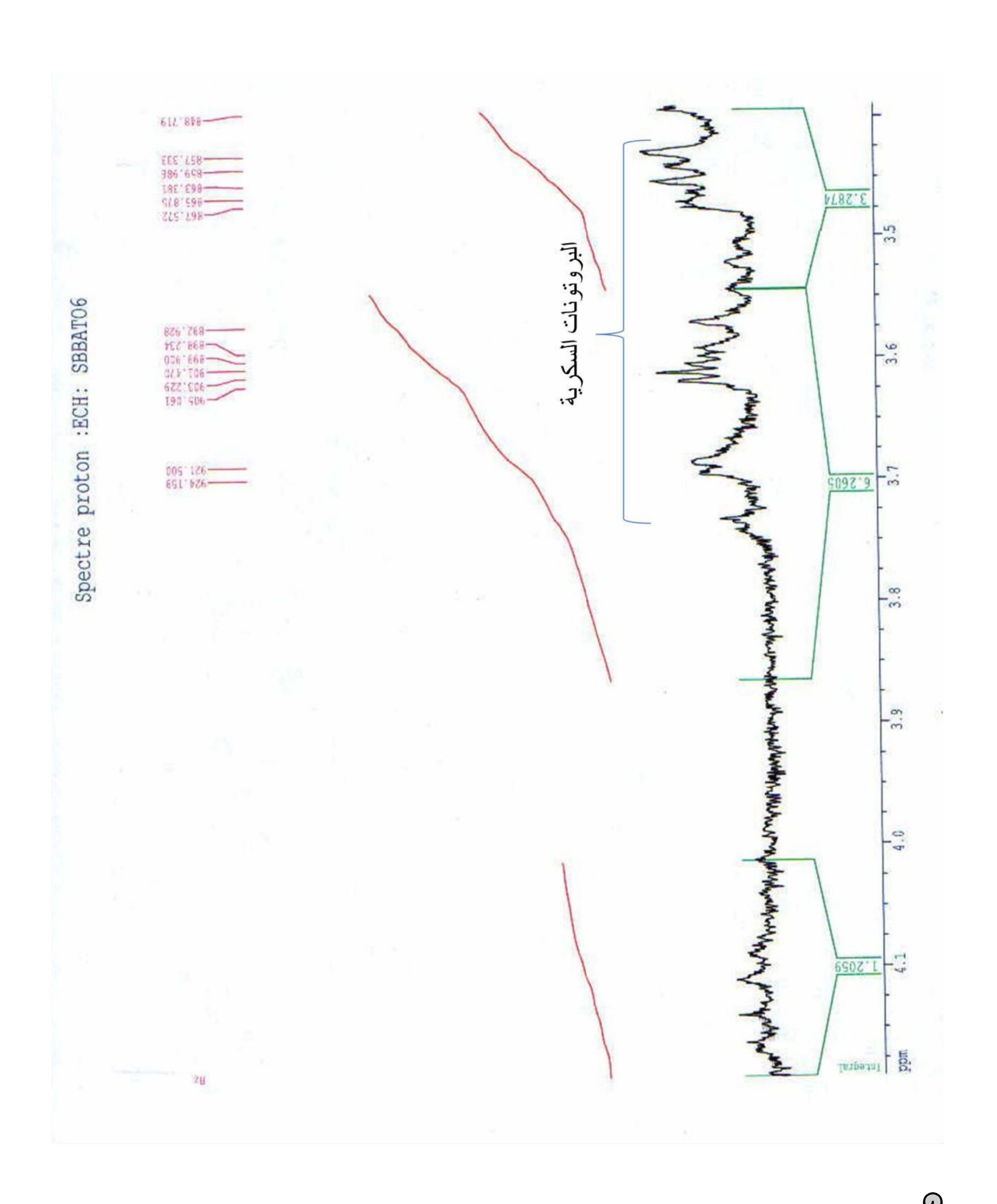
3-*O*-*β*-*D*-glucosyl kaempférol



الشكل-7-: طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب B_2 (CD_3OD)



الشكل−8−:تمديد طيف RMN ^{1}H للمركب B_2 في المجال 8-5 ppm



الشكل-9-: تمديد طيف RMN ^{1}H لبروتونات المستبدل السكري للمركب B_2 في المجال 4.25-3 ppm

IV.-2 التحليل البنيوي للمركب : $B_{2/2}$

IV .-2 1- سلوكه الكروماتوغرافي:

توضح قيم معامل الاحتباس في الجدول (4).

الجملة	SI	SII
$R_f \times 100$	19	31
اللون الإستشعاعي	اسود بنفسجي	

الجدول (4) : السلوك الكروماتوغرافي

SI : Toluène/MEC/MeOH (4 / 3 / 3)

SII : H_2O/MeOH/MEC/Acétyl acétone (13 / 3 / 3 / 1)

IV.-2-2- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

مطيافية الأشعة فوق البنفسجية الخاصة بالمركب $B_{2/2}$ موضحة بالجدول -5-

الكواشف	العصابة I (nm)	العصابة II (nm)	قمم(nm)
MeOH	358	258	
NaOH	408	272	329
$AlCl_3$	360	267	406-305
$AlCl_3$+HCl	369	264	426-305
NaOAc	360	264	301
NaOAc+H_3BO_3	378	261	301
NaOH بعد 5 دقائق : مستقر			

الجدول 5: مطيافية الأشعة فوق البنفسجية-المرئية

اللون البنفسجي تحت الأشعة فوق البنفسجية وطول العصابة (I) في الميثانول عند λ_I= 358 nm

يدلان على المركب عبارة عن فلافونول مع 3-OR (أي عدم وجود OH حر في الموضع 3).

قيم ثابت الاحتباس (R_f) تدل على أن المركب هو جليكوزيدي أحادي السكر.

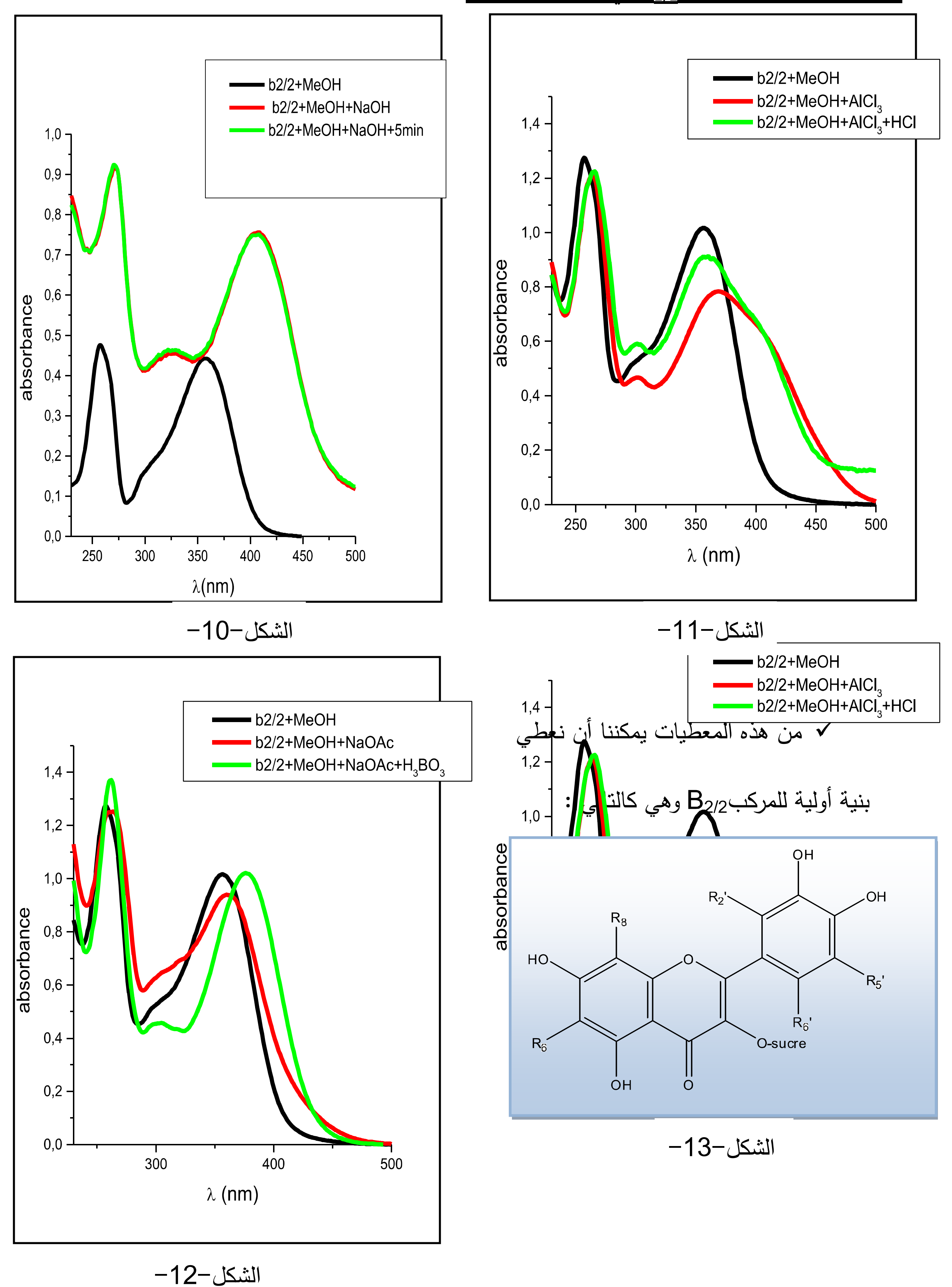
- الإزاحة الباثوكرومية بـ: $\Delta\lambda_I$ (NaOH / MeOH) = +50 nm تدل على وجود OH حر في الموضع '4 ، و استقرار طيف NaOH يؤكد غياب OH حر في الموضع 3 .

- الإزاحة الباثوكرومية بـ: $\Delta\lambda_I$ ($AlCl_3$+HCl / MeOH) = +51 nm دليل على وجود OH حر في الموضع 5.

- ظهور قمة جديدة عند 329 nm دليل على وجود OH حر في الموضع 7 في طيف NaOH، تؤكده الإزاحة الباثوكرومية بـ: $\Delta\lambda_{II}$ (NaOAc / MeOH) = +43 nm .

- الإزاحة الباثوكرومية بـ: $\Delta\lambda_I$ NaOAc+H_3BO_3= +18nm دليل على وجود أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B أي الموقع ’3 به OH حر.

سلسلة أطياف UV للمركب $B_{2/2}$ في مختلف الكواشف



الشكل-10-

الشكل-11-

✓ من هذه المعطيات يمكننا أن نعطي

بنية أولية للمركب $B_{2/2}$ وهي كالتالي :

الشكل-12-

الشكل-13-

IV.-2- 3– مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون $RMN-^1H$:

تلخص نتائج طيف–2– الرنين النووي المغناطيسي $RMN-^1H$ (CD_3OD, 250MHz). في الجدول التالي:

الإزاحة الكيميائية δ(ppm)	التكامل	التعددية	ثابت التزاوج J(Hz)	البروتون الموافق
6,2	H1	*d*	1,6	H_6
6,40	H1	*s l*	-	H_8
6,92	1H	*d*	8,2	$H_{5'}$
7,63	1H	*dd*	8,2-2,1	$.H_{6'}$
7,68	H1	*d*	2,1	$H_{2'}$
5,15	H1	*d*	7,3	H''_1
5,15-3,40		*m*		بروتونات السكر

الجدول (6) : مطيافية الرنين النووى المغناطيسى للبروتون للمركب $B_{2/2}$ ($RMN-^1H$)

يبين طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون $RMN-^1H$ (للطيف–2–) الذي دونت نتائجه في الجدول –6–

- وجود إشارة ثنائية (J = 2,1Hz) *d* بتكامل 1H عند الإزاحة الكيميائية δ = 6,20ppm و هي خاصة بالبروتون H_6
- وجود إشارة أحادية عريضة *s l* بتكامل 1H عند δ = 6,4ppm يمكن نسبتها إلى البروتون H_8
- كما يبين نفس الطيف وجود إشارة ثنائية (J = 8,2Hz) *d* بتكامل 1H عند δ = 6,92ppm يمكن نسبتها إلى البروتون $H_{5'}$
- و نلاحظ وجود إشارة ثنائي ثنائي (J = 8,2,J= 2,1Hz) *dd* بتكامل 1H عند

δ = 7,63ppm و هي إزاحة خاصة بالبروتون $H_{6'}$.

- كما نلاحظ إشارة ثنائية ($d(J = 2,1Hz)$ بتكامل 1H عند $\delta = 7,68ppm$ خاصة بالبروتون $H_{2'}$
- و نلاحظ وجود إشارة ثنائية ($d(J = 7,38Hz)$ بتكامل 1H عند$\delta = 5,15ppm$ و هي إزاحة خاصة بالبروتون الانوميري للسكر $H_{1''}$.

من كل المعطيات الطيفية السابقة (RMN^1H, UV) يمكن ان نخلص إلى أن المركب $B_{2/2}$ هو عبارة عن:

الشكل-14-

ولمعرفة نوع السكر قمنا بعملية الحلمهة الحمضية و قارنا الشق السكري لـ:

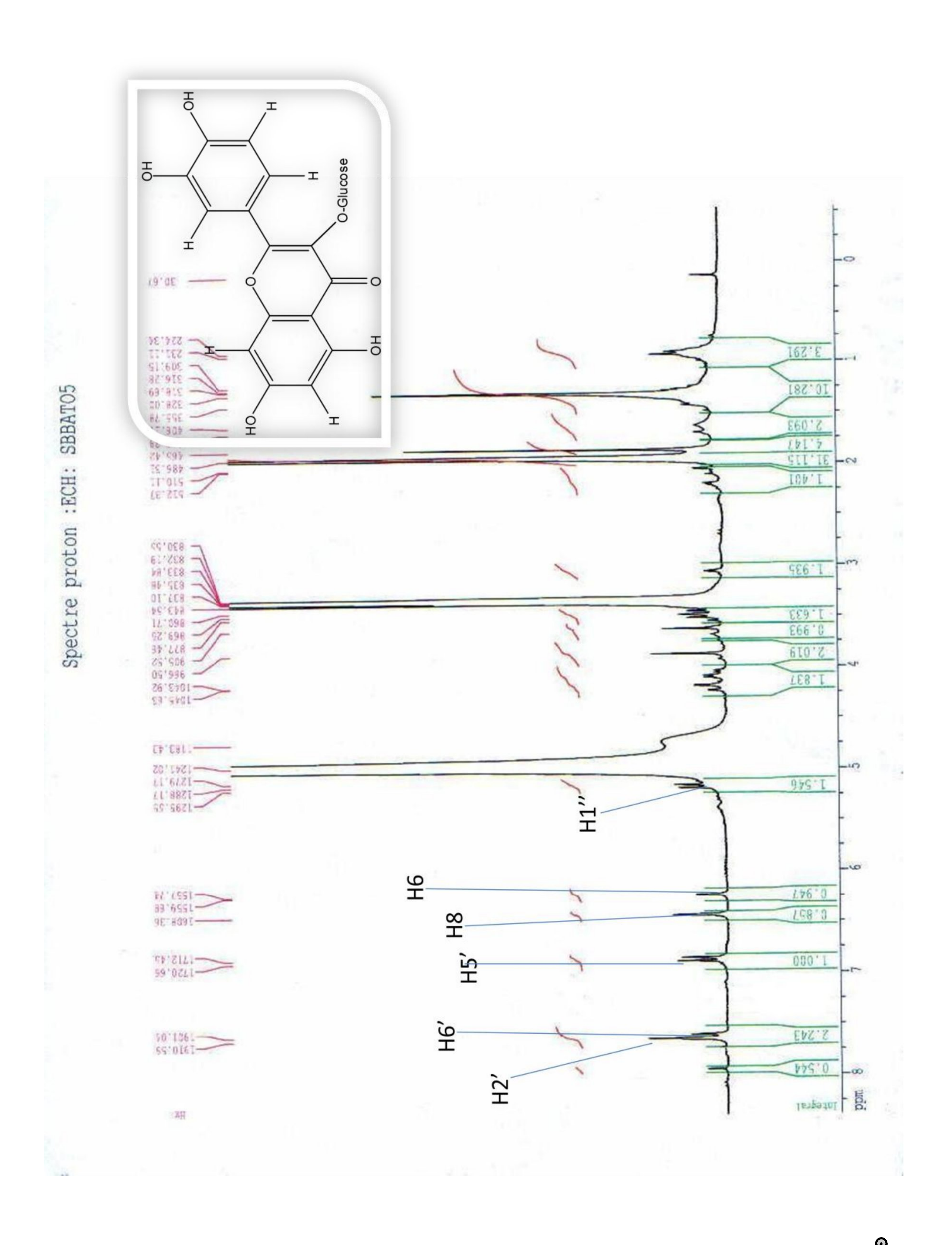
$B_{2/2}$ بعدة شواهد سكرية فوجدنا أنه يماثل شاهد*D*- glucose كما هو موضح في الصورة-1- ونظرا لثابت تزاوج البروتون الأنوميري($J = 7,38Hz$) يمكن ان نقول ان السكر هو β-*D* glucose

وتأكيدا لموقع ارتباط السكر قمنا بتسجيل طيف UV للشق الأجليكوني الذي أصبح لونه الأستشعاعي اصفر فتأكدنا ان الموقع 3 أصبح به OH حر.

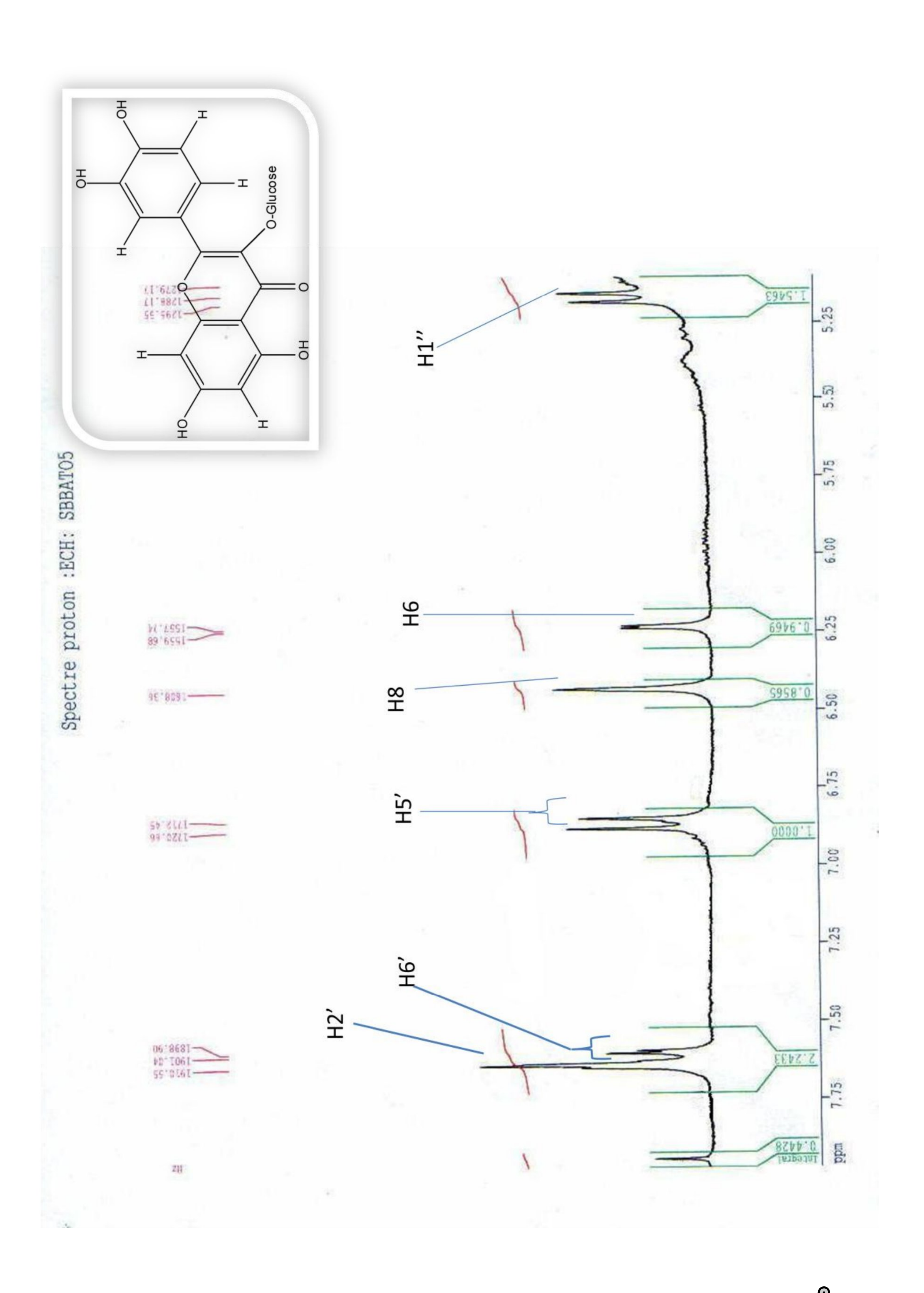
إذن البنية النهائية للمركب $B_{2/2}$ هي:

3-O-β-D- glucosyl quercetine

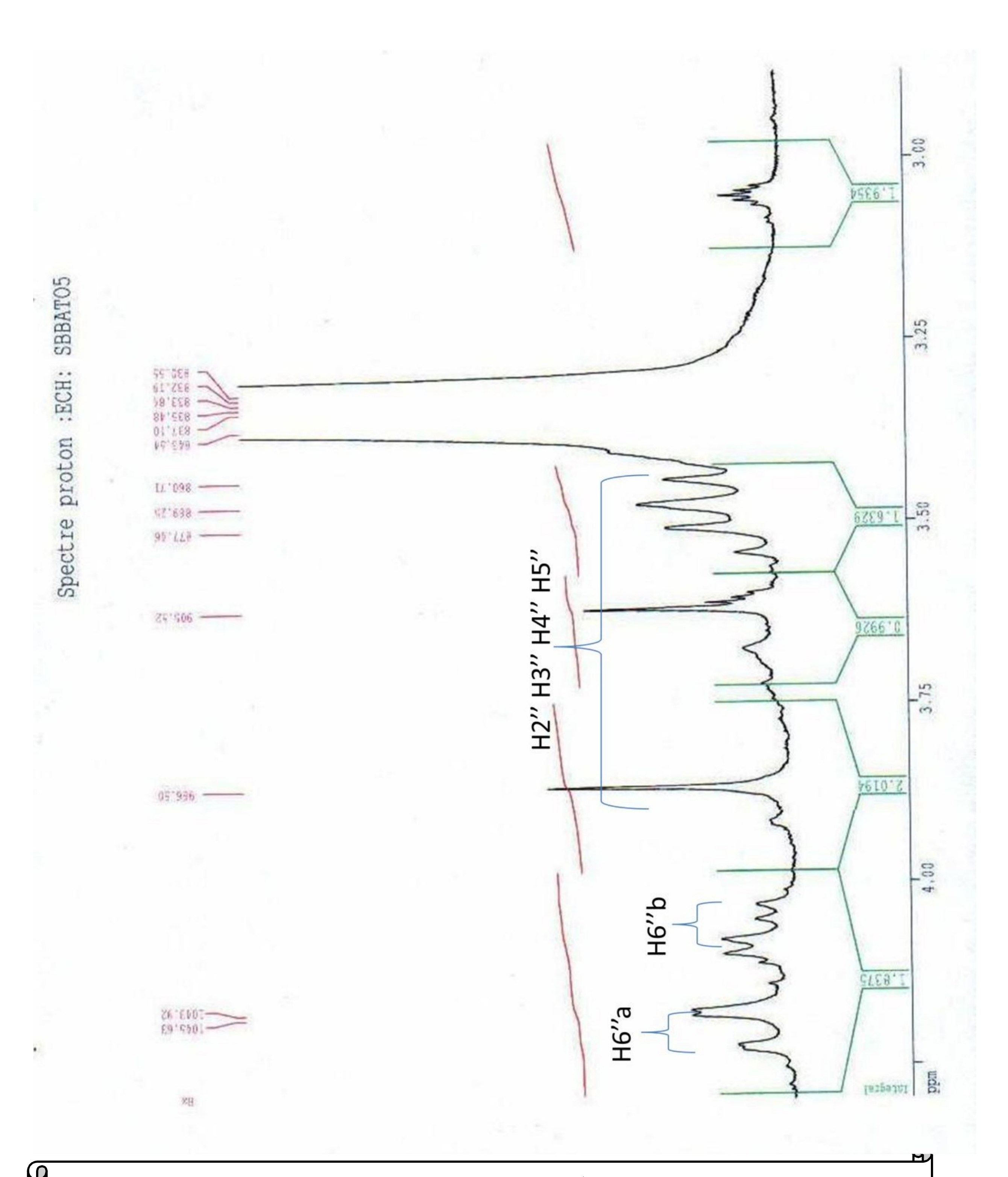
-الشكل-15-



الشكل-16-: طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب $B_{2/2}$ (CD_3OD)



الشكل–17–: تمديد طيف RMN ^{1}H للمركب $B_{2/2}$ في المجال 8-5 ppm



الشكل–18–: تمديد طيف RMN ^1H للمركب $B_{2/2}$ لبروتونات المستبدل السكري للمركب $B_{2/2}$ في المجال 4.25-3 ppm

الخاتمة

إن الغاية الرئيسية من هذا البحث هي التعرف على نواتج الأيض الثانوي من الطور خلات الايثيل لنبات *Mentha arvensis*

خلال إنجازنا لهذا البحث قمنا بدراسة ببيليوغرافية عن الفلافونويدات، و عن الطرق المستخدمة في فصل و تنقية هذه المركبات و الطرق الفيزيو كميائية لتحديد بنيتها.

اتبعنا في عملية الفصل جملة من الخطوات ابتدءا من الاستخلاص يليه فصل أولي بواسطة الطبقة الرقيقة التحضيرية بعدها القيام بعملية الفصل باستخدام كروماتوغرافيا العمود

من أجل التحديد البنيوي للمركبات استخدمنا مطيافية الأشعة فوق البنفسجية و مطيافية الرنين النووي المغناطيسي.

و قد تم فصل ثلاث مركبات فلافونيدية و تحديد مركبين فلافونيديين هما :

- 3-*O*-*β* –D- glucosyl kaempférol
- 3-*O*-*β* –D-glucosyl quercetine

المراجع

[1]- Cooper, E. (2004). Drug discovery,CAM and natural products, Evid. based complement altern. med.1, 215-217.

[2]- Tsao, G.C.I., Zeltzer, L.K., (2005). Complementary and alternative medicine approaches for pediatric pain, a review of the state-of-the-science, Evid. based complement altern med.2.149-159.

[3]- Bensky, D., Gamble, A. (1993). Chinese herbal medicine, material medica, Revised edition, seattle, W.A., Eastland press, Inc. 13-17.

[4]- Farnsworth, N.R. and Morris, R.W. (1976). Higher plants-the sleeping giant of drug development, Am. J. pharm. Sci. support public health. 148,46-52.

[5]- Mills, S.Y.(2002) « ESCOP Research Committee and European Phytotherapy Research Group ». The European Phytojournal, Issue 2.

[6]- Herbalism, W.(2001)« Clinical Reference, Integrative Medicine Communications ». www. OneMedicine.com.

[7]- Newman and all.(2003). J.Nat.Prod.

[8]- Tulkens, P. « Les plantes : Découverte des médicaments par criblage de sources naturelles et ethnopharmacologie ».

[9]- Ozenda, P. (1962), Flore du Sahara. Ed. CNRS, PARIS France.

[10]- Harborne, J. B. (1989). The flavonoids, advances in research since 1980, eds. Chapman and Hall, New York.

[11]- Harborne, J.B. (1975). Progress in phytochemistry, V. 5, eds. Swin, T, Pregamon press. Oxford.

[12]- Melcent, R. (2003). Chimie organique hétérocyclique, eds, EDP sciences.

[13]- Wollenweber, E., Dietz, V. H. (1980). Biochem. Syst & Ecol. 2, 21.

[14]-Swaint, T. (1982). chemistry and biochemistry of plant pigmens, T. W.

Goodwin, ed, Academic press, New York.

[15]- Guignard, J.L., Cosson, L., henzy, M.J. (1985). Abrégé de phytochimie, Paris, New york,
Barcelone.

[**16**]-Satyajit, D.(2007). Chemistry for Pharmacy Students, John Wiley & Sons Ltd, England.

[17]- Robinson, R. (1936). Nature. 137, 1172.

[18]- Davis, B. D. (1955). Advanceda in Enzymology. 16, 227.

[19] Harborne, J. B. (1975). The flavonoids, V.2, eds Chapman and Hall, London.

[20]- Pitshke, L., Grisebach, H. Y. (1965). Naturforsch. 20b, 1039-1042

[21]- Grisebash, H., Barz, W. (1969). Naturwiss, 56, 538-544

[22]- Harborne, J.B. (1964). Biochemistry of phenolcs compounds Academic

press, New York.

[23]- Richtre, G. (1993), «Métabolisme des végétaux» (physiologies et biochimie). Presses

polytechniques et universitaires romandes, Lausanne.

[24]- Ribereau-Gayou, J.B. (1968), «The phenolic compounds of vegetals», Dundo, Paris.

[25]- Jurd, L . (1962). The chemistry of flavonoid compounds. Geissman, Peragmon press,

New- York

[26]- Gayon, P. R., (1968). Les composés phénoliques des végétaux, eds, Dunod,

Paris

[27]- Nazemiyeh,H ., Shoeb, M., Movahhedin ,N ., Kumarasamy ,Y., Talebpour A.H., Delazar,

A.,Lutfun, N., Satyajit ,D. Sarker .(2000).Biochem. Syst. And. Ecol, 34 , 721-723

[28]- Jay, M.(1983). Z.Naturforsch, 38c, 413.

[29]- Harborne, J.B. (1967). Comparative biochemistry of the flavonoids.

[30]- Harborne, J. B. (1980). The flavonoids,.Academic press. London.

[31]- Docencia.udea.edu.co/~farmacogfit/Flavonoides/D_main.html - 3k

[32]- MARFAK, A.G. (2003). Thèse de doctorat , Université de Limoges.

[33]- Mc.Lure, J.W. (1975) In « Physiology and Fonction of flavonoids» (Harborne, J.B. eds)

Chapman and Hall. London, 970-1055.

[34]- Wollenweber, E., Dietz, V.H. (1980). Biochemical Systematicsv and ecology. 8, 21.

[35]- Halliwell, B.(1994).Nutr. Rev. 52, 253-265

[36]- Pietta, P. G.(2000). J. Nat. Prod. 63, 1035-1042

[37]- Dugas, A. J., Castaneda-Acosta, J., Bonin, G. C., Price, K. L., Fischer, N.H, Winston, G.W.(2000). J. Nat .Prod. 63: 327-31.

[38]- Van Acker, S.A.B.E., van den Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., van Bennekom, W.P., van der Vijgh, W.J.F., Bast, A. (1996). Free Rad. Biol. Med. 20, 331-342.

[39]- Ferraro, G. E. (1983). Acta farm. Bonaerense, 2, 97-103.

[40]- Middleton, E. J. R., Kandaswamir, C. (1992). Biochem. Pharmacol. 43,1167.

[41]- Elber, G., Wanger, H. (1992). Planta med. 57, 137.

[42]- Ruzicka, L. (1959). Proc. Chem. Soc, 541.

[43]- Bruneton, J. (1997). Pharmacognosie et phytochimie des plantes medicinales, eds Technique et documentation, Paris, 3éme edition, Lavoisier.

[44]- Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie et phytochimie des plantes medicinales, eds Technique et documentation, Paris, 2éme edition, Lavoisier.

[45]- Arnold, J. V., Roger, A. (1985). Advances in medicinal plant research, eds, Wissenchaft liche vrls gesellschaft mbh, Stuttgart.

[46]- Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S.(1994). Free Radic. Biol. Med. 16, 845-850.

[47]- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P.,Cimanga, K., Van-Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Vanden Berghe, D.(1998). J. Nat. Prod. 61, 71-76.

[48]- Hollman, P.C.H., Hertog, M.G.L., Katan, M.B. (1996), Food Chem. 57, 43-46.

[49]- Wang, J., Mazza G. (2002), J. Agric. Food Chem. 50, 4183-4189.

[50]- Samejima, K., Kanazawa, K. Ashida, H. Danno, G. (1995),. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 410-414.

[51]- Abd Elchakour, A. S. (1987). Chimie organique moderne et pratique. Université du Roi Abd Elaziz, Djedda, 173.

[52]- Anderson, R. A., sowres, J. (1968). phythochemistry, 7, 293.

[53]- Andersen Øyvind, M., Markham, Kenneth, R. (2006). Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications. CRC Press Taylor & Francis Group.

[54]- Francisco, A., Tomas-Barberan, F. (1990). High performance liquid chromatography, thin layer chromatography and ultra violet behaviour of flavone aglycone with unsubstituted rings . Phytochemistry. Anal. I, 44.

[55]- Combier, H., Jay, M., Voirin, B., Lebreton, P.(1974). Influence des 6 et /ou des 8-substitutions sur le comportement spectrométrique et chromatographique des flavonoides. Assemblée annuelle du « Groupe poly- phénols ». Lyon, France.

[56]- Mabry,T. J., Markham, K. R., Thomas, M.B.(1970). The systematic identification of flavonoids. Springer- Verlag, Berlin

[57]- Vernin, G. (1970), La chromatographie en couche mince, Techniques et application en chimie organiques, Dunod, Paris.

[58]- Markham, K.R.(1982). Techniques of flavonoids identification. Academic press. London.

[59]- Alain, B.(1972). La chromatographic et ses applications. Dunod, Paris.

[60]- Harborne J.B. (1988).The flavonoids, Advances in research since (1980). Chapman & Hall. London

[61]- Jurd, L. (1962). The chemistry of flavonoids compounds. Pergamon press, New – York.

[62]- Jay, M., Gonnet, J. F., Wollenweber, E., Voirin, B. (1975). Phytochemistry, 14, 1605.

[63]- Voirin, B. (1983). Phytochemistry. 22, 2107

[64]- Elhazemi, H. (1995). Natural products, eds University of King Saoud.

[65]- Jurd, L., Horowitz, R. (1962). Spectral properties of flavonoid compounds, pergamon press, Oxford, 107-2055.

[66]- El hazimi, H. (1995). Natural product, 149-190

[67]- Harborne, J. B. Swain, T. (1969). Prespectives in phytochemistry. Academic press. London

[68]- Bacon, J.D., Mabry, T. A. (1976)." Rev. Latinoamer, Quim".UV Spectral procedures for distinguishing free and substituted 7-hydroxyl groups in flavones and flavanols, 7,83-86.

[69]- Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemle, D.J. (2007). Identification spectrométrique de composes organiques, ed.2, De Boeck Université.

[70]- Markham, k. R. ., Geiger, H. (1994). The flavonoids, edited by Harborne, J. B., Chapman and Hall, London.

[71]- Markham, K.R., Mabry, T.J. (1975). In The flavonoids (Harborne, J.B., Mabry, T.J., Mabry, H.eds), p.45, Chapman and Hall . London.

[72]- Harowitz, R. M., Gentili, B., (1966). Chem. Ind., Londo, 625.

[73]- Markham, K. R.,Tenai, B., Geiger, H., Mabry, T. J. (1978)" Tetrahedron" Carbon-13 NMR.Studies of flavonoids III., 34,1389-1397.

[74]- Audier, H. (1966). Etude des composés flavoniques par spectrométrie de masse.

[75]- Cuyckens, F., Claeys, M. (2004)." Journal of Mass Spectrometry" Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids, 39, 1-15.

[76]- Zararka, T.C. (1994) « Méthodes spectroscopique d'analyse chimique » .O.P.U

[77]- Markham, R. (1995). Les facteurs anti –nutritionnels (F.A.N) phénoliques de Pisum sativum et de Vica fabal (Leguminosae) : Aspects structuraux. Thèse de doctorat, univ. Claude Bernard, Lyon I.

[78]- Voirin, B. (1970).Thèse de doctorat, université de Lyon.

[79]- Gonnet, J.F. (1973). A propos de la photographie en couleur de chromatographie sur couches minces en lumière de Wood. J. of cromato. 86, 192

[80]-Tochio, I., Yuko, S., Hideki, M., chiaki, K. (2002). Biol pharm bull, 25, 256-258.

[81]-Jäger, A. K., Almqvist, J. P., Vansøe, S. A. K., Stafford, G. I., Adersen, A., Vanstaden, J. (2007). South African journal of botany, 73, 518-521.

[82]-Sharaf, M., El-ansari, M. A., Saleh, N. A.M. (1999). Fitoterapia, 70, 478-482.

[83]-Voirin, B., Bayet, C., Faure, O., Jullien, F. (1999). Phytochemistry, 50, 1189-1193.

[84]-El-Desoky, S.K., El-ansari, M. A., El-Negoumy, S.I. (2001). Fitoterapia, 72, 532-537.

[85]-Janićijević, J., Tošić, S., Mitrović, T. (2007). flavonoid in plant serbia, 01-03.

[86]-Akroum, S., Bendjaddou, D., Satta, D., Lalaui, K. (2009). Americane_rasian journal of scientific research, 4,93-96.

الملخص

هدفنا الرئيسي من هذا البحث هو فصل وتحديد منتجات الأيض الفلافونيدي لطور خلات الايثيل للنبتة *Mentha arvensis* التي تنتمي إلى العائلة الشفوية، وقد تمكنا من فصل مركبين فلافونيديين باستعمال مختلف التقنيات الكروماتوغرافية (كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM كروماتوغرافيا العمودCC، كروماتوغرافيا الورقCP،). و باستعمال الإماهة الحمضية و مختلف الطرق الفيزيوكيميائية من مطيافية الأشعة فوق البنفسجية UV و مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ^{1}H RMN تم تحديد بنى المركبات المفصولة:

- 3-O-β D glucosyl kaempférol
- 3-O-β D glucosyl quercetine

Résumé

L'objectif principal de ce travail est d'identifier des métabolites secondaires (flavonoïdes) de la plante *Mentha arvensis* appartenant à la famille de Lamiaceae (Labiées).

L'utilisation des différentes méthodes de séparation chromatographiques (, colonne, papier couche mince) a permis d'isoler deux composés flavonique, et grâce à l'hydrolyse acide et aux méthodes spectroscopiques usuelles (UV et RMN ^1H), les structures de ces flavonoïdes ont été établies comme suivant :

- 3-O-β D glucosyl kaempférol
- 3-O-β D glucosyl quercetine

Abstract

The principal aim of the present work consisted to identify the secondary metabolites (flavonoids) of *Mentha arvensis* belonging to the Lamiaceae family.

The use of the different chromatographic methods (thin layer, column, paper) permitted the isolation of two flavonoids and with using acid hydrolysis and usual spectroscopic methods (UV, ^{1}H NMR), the structures of this compounds were established as:

- 3-O-β D glucosyl kaempférol
- 3-O-β D glucosyl quercetine